BEEINFLUSSUNG MONOAMINERGER TRANSMITTERSYSTEME IM RATTENGEHIRN DURCH IMIPRAMIN UND LITHIUM

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Michael Türck
aus Stuttgart

1981

2 215

BEEINFLUSSUNG MONOAMINERGER TRANSMITTERSYSTEME IM RATTENGEHIRN DURCH IMIPRAMIN UND LITHIUM

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Michael Türck
aus Stuttgart

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung :	20. Januar 1981
Dekan :	Prof. Dr. E. Reinhard
1. Berichterstatter :	Prof. Dr. J.E. Schultz
2. Berichterstatter :	Prof. Dr. E. Reinhard

Für meine Eltern

und Doris

Die Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden unter Leitung von Herrn Prof. Dr. J.E. Schultz am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. J.E. Schultz danke ich für die Überlassung des Themas, für die intensive Betreuung und großzügige Unterstützung und für die stete Bereitschaft zur kritischen und anregenden Diskussion.

Herrn Prof. Dr. G. Breitling danke ich dafür, daß er es mir ermöglichte, am medizinischen Strahleninstitut der Universität Tübingen die Röntgenbestrahlungen der Ratten durchzuführen, und für die freundliche Beratung. Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dipl.-Phys. U. Sailer bedanken, der mir bei Problemen mit dem Röntgengerät zu jeder Tages- und Nachtzeit hilfreich zur Seite stand und mir die Felddosen bestimmte.

Herrn Dr. W. Koch und den Damen im Laboratorium der Universitäts-Nervenklinik Tübingen danke ich für die Bestimmung der Lithium-Spiegel im Serum.

Herrn Dr. habil. H. Wolburg danke ich für die mikroskopische Untersuchung der bestrahlten Kleinhirne.

Dem DAAD danke ich für das Stipendium an die University of Texas, Health Science Center at Dallas.

Herrn Prof. Dr. D.J. Woodward danke ich für die Einladung zur Arbeit in seinem Laboratorium und Herrn Hermes Yeh dafür, daß er mich in die Geheimnisse der Rattenbestrahlung einwies.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Herrn Dr. W.F. Schocker für die kollegiale Hilfsbereitschaft im Labor und die gute Kameradschaft bedanken.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548919_0050

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Abkürzungen	1
2.	Einleitung	3
3.	Material und Methoden	8
3.1.	Chemikalien	8
3.1.1.	Radiochemikalien	8
3.1.2.	Lösungen	9
3.2.	Geräte	9
3.3.	Tiere	10
3.4.	Vorbehandlung der Tiere	11
3.4.1.	Vorbehandlung mit IMI oder LiCl	11
3.4.2.	Vorbehandlung mit 6-OHDA	12
3.5.	Röntgenbestrahlung von neugeborenen Ratten	13
3.5.1.	Linac-Bestrahlung	14
3.5.1.1.	Bestrahlung von Sprague-Dawley-Ratten	14
3.5.1.2.	Bestrahlung von Long-Evans-Ratten	15
3.5.2.	Maxitron-Bestrahlung	18
3.5.3.	Baupläne der Halter für die Jungtiere	19
3.5.3.1.	Modell für Linac	19

		Seite
3.5.3.2.	Modell für Maxitron	20
3.6.	Präparation der Gehirnteile	20
3.7.	Inkubation der Gehirnschnitte	21
3.8.	Säulenchromatographische Reinigung des cAMP	22
3.9.	Quantitative Bestimmung von cAMP	23
3.9.1.	Prinzip des Gilman-Tests	23
3.9.2.	Durchführung des Gilman-Tests	24
3.10.	Proteinbestimmung	26
3.10.1.	Biuret-Methode	26
3.10.2.	Lowry-Methode	26
3.11.	Präparation der zellfreien AC	27
3.12.	Test der zellfreien AC	27
3.13.	Präparation der PDE	29
3.14.	Test der PDE-Aktivität	29
3.15.	Serotoninbindungstest	30
3.15.1.	Durchführung des Tests	30
3.15.2.	Einfluß von Tiefgefrieren der Gehirne auf die ^{3}H-5-HT-Bindung	31
3.16.	Dihydroalprenololbindungstest	32
3.16.1.	Durchführung des Tests	32
3.16.2.	Wahl der Inkubationsgefäße	33

		Seite
3.16.3.	Einfluß von Tiefgefrieren der Gehirne auf die ^{3}H-DHA-Bindung	35
3.17.	Auswertung der Ergebnisse	36
4.	E r g e b n i s s e	37
4.1.	Untersuchungen am cAMP-System in Schnitten von verschiedenen Gehirnteilen der Ratte	37
4.1.1.	cAMP-Bildung in der Cortex cerebri nach Vorbehandlung der Tiere mit IMI: NA-Stimulation und Einfluß von IBMX und Ascorbinsäure	37
4.1.2.	Auswirkung unterschiedlicher täglicher IMI-Gaben auf die NA-stimulierte cAMP-Bildung	39
4.1.3.	Einfluß der IMI-Behandlung auf die cAMP-Bildung im Hippocampus und im Corpus striatum	41
4.1.3.1.	Einfluß der IMI-Behandlung auf die cAMP-Bildung im Corpus striatum	42
4.1.3.2.	Einfluß der IMI-Behandlung auf die cAMP-Bildung im Hippocampus	43
4.1.4.	Auswirkungen einer kombinierten Behandlung mit 6-OHDA und IMI auf die NA-stimulierten cAMP-Werte in der Cortex cerebri	43
4.1.5.	Wirkung von Antagonisten auf die NA-stimulierte cAMP-Bildung in der Cortex cerebri nach einer IMI-Behandlung	46
4.1.5.1.	Hemmung der NA-stimulierten cAMP-Bildung mit Propranolol	46
4.1.5.2.	Hemmung der NA-stimulierten cAMP-Bildung mit Phentolamin	47

		Seite
4.2.	Auswirkungen der Lithium-Behandlung auf die cAMP-Bildung in verschiedenen Gehirnteilen	49
4.2.1.	Auswirkung der Lithium-Behandlung auf die cAMP-Werte im Corpus striatum	49
4.2.2.	Auswirkung der Lithium-Behandlung auf die cAMP-Werte im Hippocampus	50
4.2.3.	Auswirkungen der Lithium-Behandlung auf die cAMP-Bildung im Cerebellum	51
4.3.	Untersuchungen an zellfreien partikulären AC-Präparationen aus verschiedenen Gehirnregionen der Ratte	52
4.3.1.	Einfluß verschiedener Puffer auf die AC aus Cortex cerebri	53
4.3.2.	Einfluß von IMI auf eine zellfreie AC aus Cortex cerebri	55
4.3.3.	Einfluß von 1 h Inkubation als Gewebeschnitte auf die zellfreie AC aus Cortex cerebri	57
4.3.4.	Einfluß von DMI in vitro auf die AC-Aktivität	60
4.3.5.	Stimulation der AC mit GMP-PNP und F^--Ionen	61
4.3.6.	Einfluß von IMI auf die zellfreie AC aus Cerebellum, Hippocampus und Corpus striatum	63
4.4.	Messung der PDE-Aktivität nach einer IMI-Behandlung	66
4.5.	Einfluß einer IMI- bzw. Lithium-Behandlung auf die DHA-Bindung in verschiedenen Gehirnteilen	67

		Seite
4.5.1.	Einfluß der IMI-Behandlung auf die DHA-Bindung in der Cortex cerebri	67
4.5.2.	Einfluß von DMI in vitro auf die DHA-Bindung in der Cortex cerebri	69
4.5.3.	Einfluß der IMI-Behandlung auf die DHA-Bindung im Cerebellum	70
4.5.4.	Einfluß der Lithium-Behandlung auf die DHA-Bindung im Cerebellum	72
4.6.	Einfluß der IMI-Behandlung auf die 5-HT-Bindung in verschiedenen Gehirnteilen	74
4.6.1.	Einfluß der IMI-Behandlung auf die 5-HT-Bindung in der Cortex cerebri	75
4.6.2.	Auswirkungen der IMI-Behandlung auf die 5-HT-Bindung im Corpus striatum und im Hippocampus	76
4.6.3.	Auswirkungen von DMI in vitro auf die 5-HT-Bindung in der Cortex cerebri	77
4.7.	Untersuchungen mit röntgenbestrahlten Ratten	78
4.7.1.	Kurzer Abriß der Anatomie der Kleinhirnrinde und deren Entwicklung	80
4.7.2.	Auswirkung von Röntgenstrahlen auf das sich entwickelnde Cerebellum von Ratten	82
4.7.3.	Einfluß der IMI-Behandlung auf das cAMP-System des degranulierten Cerebellums	82

			Seite
	4.7.4.	Einfluß der Lithium-Behandlung auf das cAMP-System des degranulierten Cerebellums	84
	4.7.5.	Einfluß der Lithium-Behandlung auf die DHA-Bindung im degranulierten Cerebellum	85
5.	D i s k u s s i o n		86
	5.1.	Imipramin	86
	5.2.	Lithium	98
6.	Z u s a m m e n f a s s u n g		100
7.	L i t e r a t u r		102

1. Abkürzungen

AC	Adenylatzyklase
B_{max}	maximale Anzahl der Bindungsstellen
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cpm	Zähleranschläge pro Minute
DA	Dopamin
DHA	Dihydroalprenolol
DMI	Desipramin
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGTA	3,6-Dioxaoctamethylendinitrilotetraessigsäure
f	female = weiblich
GMP-PNP	Guanylylimidodiphosphat
5-HT	5-Hydroxytryptamin = Serotonin
IBMX	1-Methyl-3-isobutylxanthin
IMI	Imipramin
i.p.	intraperitoneal
K_D	Dissoziationskonstante
LSC	Flüssigkeitsszintillationszählung (-zähler)
m	male = männlich
NA	Noradrenalin
n.s.	nicht signifikant
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
PDE	Phosphodiesterase
Phen	Phentolamin
PPN	Polypropylen
PPO	2,5-Diphenyloxazol
Prop	Propranolol
PS	Polystyrol
r	Korrelationskoeffizient
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.e.m.	Standardfehler
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

2. Einleitung

Lithium und das Dibenzazepin IMI sind zwei Pharmaka, die verbreitet zur Behandlung von Erkrankungen des manisch-depressiven Formenkreises angewendet werden. Obwohl beide Pharmaka seit über zwanzig Jahren in die Therapie eingeführt sind, ist über ihren molekularen Wirkungsmechanismus wenig bekannt. Das liegt einerseits daran, daß es für die manisch-depressiven Erkrankungen bisher kein geeignetes Tiermodell gibt. Andererseits haben Forschungsergebnisse, die mit diesen Pharmaka in vitro oder nach einmaliger Gabe erzielt wurden, jahrelang den Blick auf das eigentliche Problem verstellt, nämlich wie diese Arzneimittel bei längerer Verabreichung in den Gehirnstoffwechsel bzw. in die synaptische Informationsübertragung eingreifen.

Die antidepressive Wirkung von IMI wurde entdeckt, als die Geigy AG in den Fünfzigerjahren auf der Suche nach neuen Neuroleptika den 1899 von Thiele und Holzinger (94) erstmals synthetisierten Grundkörper Iminodibenzyl zu Molekülvariationen heranzog (45). Dieses Forschungsprogramm war durch die Entdeckung der antipsychotischen Wirkung von Chlorpromazin ausgelöst worden. Chlorpromazin wurde bei der systematischen Molekülveränderung von Antihistaminika gefunden. Alle trizyklischen psychoaktiven Substanzen haben antihistaminerge Wirkungsqualitäten.

Auf der Suche nach dem Wirkungsmechanismus von IMI beschrieben Domenjoz und Theobald (25) als erste den Antagonismus von IMI zu Reserpin; dieser Antagonismus läßt sich als eine Verstärkung zentraler katecholaminerger Funktionen deuten. Die Potenzierung der Katecholaminwirkung wurde durch Axelrod et al. (8) experimentell erklärt, indem er zeigte, daß IMI die Rückaufnahme von NA aus dem

synaptischen Spalt in die präsynaptische Nervenendigung hemmt. Die Blockade des NA-Rückaufnahmesystems kommt einer Reizverstärkung gleich, da - vorausgesetzt, daß andere Parameter nicht entscheidend beeinflußt werden - dadurch die Konzentration von NA im synaptischen Spalt erhöht und die Kontaktzeit mit den postsynaptischen Rezeptoren verlängert wird.

In Übereinstimmung mit Axelrods Untersuchungen und aufbauend auf klinischen Ergebnissen veröffentlichte Schildkraut 1965 (79) seine grundlegende Arbeit "The catecholamine hypothesis of affective disorders", die einen Zusammenhang zwischen Depression und NA-Defizit in zentralen Synapsen herstellt. Diese Arbeit ist die Basis der heute verbreiteten Lehrmeinung, obwohl die Hypothese bis heute nicht eindeutig bewiesen werden konnte.

Einen wichtigen Einschnitt in die Erforschung der Biochemie der Psychopharmaka brachte die Erkenntnis, daß in peripheren und zentralen Synapsen die Information über für bestimmte Neurotransmitter spezifische Rezeptoren übertragen wird. Diese Rezeptoren können an eine AC gekoppelt sein und so die intrazelluläre Konzentration an cAMP ("second messenger") regeln (23,37). Der Einfluß von Psychopharmaka auf die Aktivität und Regulation der AC wurde so bald zum Brennpunkt des Forschungsinteresses.

Vetulani et al. (99) und Schultz (81) konnten unabhängig voneinander zeigen, daß eine längere Behandlung gesunder Ratten mit IMI bzw. DMI zu einer verminderten Empfindlichkeit des zentralen cAMP-Systems gegenüber NA führt. Die durch NA stimulierte Bildung von cAMP betrug nur ca. 50% des Wertes, der in unbehandelten Tieren erreicht wird, während die Basalwerte in beiden Versuchsgruppen gleich waren. Dieses Ergebnis ist umso bemerkenswerter, als sich der zeitliche Verlauf der Entwicklung der Subsensitivität mit dem des klinischen Wirkungsein-

tritts weitgehend deckt.

Ein zweiter entscheidender Einschnitt in die experimentelle Psychopharmakaforschung wurde durch die Entwicklung von Methoden gemacht, die es ermöglichen, die Dichte von Rezeptoren auf der Zelloberfläche bzw. ihre Affinität zum jeweiligen Liganden unmittelbar zu messen. Mit Hilfe solcher Tests war es nicht nur möglich, die Rezeptorendichte zu messen, sondern es wurden auch ganz neue Klassen von Neurotransmittern, die bis dahin postuliert waren, erkannt, so z.B. die Endorphine oder die Substanz P.

Diese Methoden ermöglichten es auch erstmals, Veränderungen an den Neurotransmitter-Rezeptoren, die in der Folge einer Psychopharmakatherapie eventuell entstehen, unmittelbar zu messen. Man erkannte in den folgenden Jahren, daß die synaptische Struktur sich gegenüber Eingriffen in das neuronale Übertragungssystem plastisch verhält. So kann sich z.B. die postsynaptische Membran durch Neusynthese von Rezeptoren einem durch Denervation bedingten Neurotransmittermangel anpassen (100). Diese Rezeptor-Bindungstechniken sollten also auch neue Einblicke in den molekularen Wirkungsmechanismus von Psychopharmaka zulassen.

Während bei der Erforschung des Wirkungsmechanismus der trizyklischen Antidepressiva das Interesse immer den Wechselwirkungen der Pharmaka mit synaptischen Übertragungsmechanismen galt, war der Ansatzpunkt der Lithium-Forschung lange Zeit ein völlig anderer. Li^+ als Alkali-Kation wurde immer mit dem zellulären K^+/Na^+-Gleichgewicht in Zusammenhang gebracht. So wurde der Einfluß von Lithium auf aktive Ionentransportsysteme und passive Ionendiffusion untersucht, ohne allerdings einen zwingenden Zusammenhang zwischen depressivem oder manischem Zustand oder einer Lithiumtherapie feststellen zu können.

Stellvertretend für viele Arbeiten in diese Richtung sei auf die Ergebnisse von Frazer et al. aus dem Jahr 1978 (32) hingewiesen. Frazer konnte keinen Effekt von Li^+ auf den Na^+-Transport bzw. die Na^+-Diffusion durch die Membran von Erythrozyten - einem weitverbreiteten Modell zur Simulierung des Ionentransports durch die Nervenzellmembran - feststellen.

Erst in den Siebzigerjahren wandte man sich bei der Untersuchung des Wirkungsmechanismus von Lithium den Neurotransmittersystemen und vor allem dem zyklischen Nukleotidsystem zu.

Aber auch hier wurden - wie bei den ersten Untersuchungen zur IMI-Wirkung - vor allem die Effekte von "in vitro" Lithium oder von einmaligen hohen Lithiumgaben untersucht. Hier ist anzumerken, daß es relativ schwierig ist, bei Tieren über längeren Zeitraum therapeutische Spiegel von Lithium aufrecht zu erhalten, ohne toxische Schädigungen hervorzurufen, da die therapeutische Breite von Lithium sehr schmal ist.

Forn und Valdecasas (29) zeigten, daß hohe Konzentrationen von Lithium die Stimulation der AC dosisabhängig hemmen, wobei es nicht wichtig war, mit welchem Neurotransmitter die AC stimuliert wurde. Reches et al. (73) hingegen fanden im therapeutisch sinnvollen Konzentrationsbereich (< 1 mval) nur eine Hemmung der noradrenergen, nicht aber der dopaminergen AC.

Nach Langzeitbehandlung mit Lithium zeigten Pert et al. (69), daß Lithium die postsynaptischen Rezeptoren stabilisiert, d.h., daß die Plastizität der synaptischen Reizübertragung verringert wird. Mit dieser These befaßten sich im Folgenden verschiedene Forschergruppen (32, 34), ohne die Ergebnisse im Einzelnen wiederholen oder widerlegen zu können. Ein Bezug zur pharmakologischen

Wirkung konnte dabei nicht hergestellt werden.

Die Arbeiten, die ursächlich den Anstoß gaben, Lithium in die Untersuchungen dieser Arbeit mit einzubeziehen, wurden im Laboratorium von F. Bloom am Salk Institut in San Diego durchgeführt. Dort wurde von Siggins und Schultz (88) gezeigt, daß IMI die NA-Sensitivität der Purkinje-Zellen im Kleinhirn vermindert, während Lithium sie steigert.

Daraus ergaben sich die Ziele der vorliegenden Arbeit:

1) Mit neuen methodischen Ansätzen (zellfreie AC, Bindungstest) in Fortführung der Arbeiten von Schocker (80) die molekularen Grundlagen der noradrenergen Subsensitivität der AC im Großhirn nach IMI-Behandlung untersuchen.

2) Eventuelle Auswirkungen von IMI auf andere Gehirnteile prüfen

3) Die Wechselwirkungen von IMI mit anderen Neurotransmittersystemen (5-HT, DA) untersuchen.

4) Prüfen, ob Lithium und IMI einen ähnlichen Wirkungsmechanismus haben.

5) Versuchen, die elektrophysiologischen Ergebnisse der Gruppe um F. Bloom mit biochemischen Experimenten zu belegen.

3. Materialien und Methoden

3.1. Chemikalien

Behringwerke, Marburg	BSA
Boehringer, Mannheim	AMP, ATP, cAMP, GMP-PNP, PDE aus Rinderherz
Ciba-Geigy, Basel	DMI-HCl, IMI-HCl
EGA-Chemie, Steinheim	IBMX
ICI, Frankfurt	Prop-HCl
Riedel-de Haën, Seelze	Äthylenglykolmonomethyläther
Serva, Heidelberg	Dowex 50 WX 4 200 - 400 mesh, Dowex 50 WX 8 200 - 400 mesh, NA-bitartrat, Kreatinkinase aus Kaninchenmuskel 40 U/mg, Kreatinphosphat, SDS, Tris
Sigma, München	DA-HCl, Kreatinkinase aus Kaninchenmuskel 117 U/mg, Kreatinphosphat, 6-OHDA-HCl
Merck, Darmstadt	alle übrigen Chemikalien

3.1.1. Radiochemikalien

Amersham-Buchler, Braunschweig	^{3}H-cAMP 32 Ci/mmol, ^{3}H-DHA 30 Ci/mmol und 59 Ci/mmol, α-^{32}P-ATP 300 Ci/mmol
New England Nuclear	^{14}C-cAMP 45 mCi/mmol, ^{3}H-5-HT 37 Ci/mmol

3.1.2. Lösungen

Krebs-Ringer-Medium:	NaCl	122 mM
	D-Glucose	10 mM
	$NaHCO_3$	25 mM
	KCl	3 mM
	KH_2PO_4	0.4 mM
	$MgSO_4$	1.2 mM
	$CaCl_2$	1.3 mM
	in demineralisiertem H_2O	
Biuret Reagenz:	demin. H_2O	800 ml
	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	4.7 g
	K-Na-tartrat	9.0 g
	1 N NaOH	200 ml
	KJ	5.0 g
Alkalisches Cu-Reagenz:	$CuSO_4$ 1%	1.0 ml
(für Proteinbestimmung	K-Na-tartrat 2.7%	1.0 ml
nach Lowry (53))	Na_2CO_3 2% in	
	0.1 N NaOH	100.0 ml
Bray-Szintillator:	PPO	7.6 g
(modifiziert nach (15))	Naphthalin	120.0 g
	Äthylenglykol	40 ml
	Methanol	200 ml
	Dioxan	1760 ml
Toluol-Szintillator:	PPO	10.9 g
	Äthylenglykol-monomethyläther	730 ml
	Toluol	2000 ml

3.2. Geräte

Gewebeschneider	The Mickle Laboratory
(McIlwain Tissue Chopper)	Engineering Comp., England

Homogenisatoren	Wheaton Company, USA
Zentrifuge Variofuge S	Heraeus-Christ, Osterode
Zentrifuge Sorvall RC-5	Du Pont de Nemours, Bad Nauheim
Dilumatik	Braun, Melsungen
Glasfiberfilter GF/B	Whatman, England
Celluloseacetatmembranfilter BA 85	Schleicher & Schüll, Dassel
Photometer PM 6 mit Drucker XP 2	Zeiss, Oberkochen
LSC Isocap 300	Searle, Heusenstamm
Stereotaktische Apparatur	David Kopf, USA
Kleinbohrmaschine	Conrad Electronic, Hirschau
Operationsbesteck und Edelstahlklammern (Michel 14 × 3 mm)	Aesculap, Tuttlingen
Infrarotlampe Theratherm 250 W	Osram
Linearbeschleuniger Linac 8 MeV	Phillips, England
Maxitron 300 keV	General Electric

3.3. Tiere

Ratten Sprague-Dawley, m	E. Jautz, Kisslegg
Ratten Long-Evans, f & m (für Röntgenbestrahlung)	Zentralinstitut für Versuchstiere, Hannover
Ratten Sprague-Dawley, f (für Röntgenbestrahlung)	Ch. River, Boston USA

Die Tiere wurden in einem thermostatierten Raum (25° C)

mit konstantem Hell-Dunkel-Rhythmus (7^{00} bis 19^{00} hell) gehalten. Sie erhielten - sofern nicht anders vermerkt - Wasser und Trockenfutter (Altrumin-Standarddiät) ad libitum.

3.4. Vorbehandlung der Tiere

3.4.1. Vorbehandlung mit IMI oder LiCl

Die wäßrigen Lösungen wurden mit einer Schlundsonde (oral) zwischen 8^{00} und 10^{00} verabreicht. Kontrolltiere erhielten die entsprechende Menge Wasser.

IMI-Tiere wurden - wenn nicht anders erwähnt - 9 Tage mit einer IMI-Lösung (6 mg IMI-HCl/ml) vorbehandelt. Die tägliche Dosis betrug 30 mg IMI-HCl/kg Körpergewicht (0.5 ml/100 g). Die Tiere wurden ca. 24 h nach der letzten IMI-Gabe getötet.

Lithium-Tiere erhielten 10 Tage lang eine LiCl-Lösung (12 mg/ml). Die tägliche Dosis betrug 60 mg LiCl/kg Körpergewicht (0.5 ml/100 g); zusätzlich wurde dem Trinkwasser 60 mg LiCl/l und 9 g NaCl/l zugesetzt. Die gesamte tägliche Lithium-Aufnahme beträgt unter diesen Bedingungen ca. 75 mg/kg. Die Lithium-Behandlung führt zu einer verstärkten Diurese mit erhöhter Na^+-Ausscheidung, was durch NaCl im Trinkwasser ausgeglichen wurde. Die Tiere zeigten unter diesen Bedingungen keine Zeichen einer Lithium-Intoxikation, nahmen aber etwas langsamer an Gewicht zu als Kontroll-Tiere, wie aus Tabelle 3.1. ersichtlich ist.

Tabelle 3.1. Gewichtszunahme bei Lithium- und Kontroll-Tieren

	Gewichtszunahme/10 Tage in g	
Kontroll-Tiere	63.2 ± 7.6	(24)
Lithium-Tiere	53.7 ± 8.3	(24)

Die Tiere wurden ca. 1 h nach der letzten Lithium-Gabe getötet. Alle Tiere wogen zu diesem Zeitpunkt zwischen 200 g und 250 g. Die Lithium-Spiegel im Serum betrugen 0.78 ± 0.02 mval/l. Die Lithium-Spiegel wurden flammenphotometrisch im Laboratorium der Universitäts-Nervenklinik Tübingen bestimmt.

3.4.2. Vorbehandlung mit 6-OHDA

Ratten von 200 - 240 g Gewicht wurden in Chloralhydrat-Narkose (5% Chloralhydratlösung, 0.5 ml/100 g Körpergewicht + 0.5 ml/Tier) mit 6-OHDA intraventrikulär injiziert.

Dem Tier wird, sobald es keine Schmerzreflexe mehr zeigt, in einer stereotaktischen Apparatur der Kopf fixiert. Die Kopfhaut wird sagittal aufgeschnitten und die dem Knochen aufliegende Haut beiseite geschoben. Dann wird die Kanüle einer in der stereotaktischen Apparatur eingespannten 10 µl-Hamilton-Spritze auf Bregma ausgerichtet. Bregma ist der Punkt, an dem die Pfeilnaht die Kranznaht kreuzt. Die Nadelspitze wird 2.0 mm caudal und 2.5 mm lateral verschoben und der so erreichte Punkt markiert. Hier wird ein Loch in die Schädeldecke gebohrt, bis nur noch eine hauchdünne Knochenschicht stehenbleibt. Kommt es dabei zu stärkeren Blutungen, wird mit eiskalter isotoner NaCl-Lösung abgetupft. Die Kanüle wird mit Hilfe der stereotaktischen Apparatur abgesenkt, bis sie

die noch anstehende Knochenschicht gerade berührt, und dann 3.0 mm tief eingestochen. Die 6-OHDA-Lösung wird langsam (1 µl/10 s) injiziert. Nach Beendigung der Injektion wird 30 s gewartet, bevor die Kanüle herausgezogen wird. Das Operationsfeld wird nochmals abgetupft, die Kopfhaut über das Loch in der Schädeldecke geschoben und die Wunde mit Edelstahlklammern verschlossen. Die gesamte Operation dauert ca. 10 min.

Lösungen:

250 µg 6-OHDA-HCl in 10 µl physiologischer NaCl-Lösung + 0.1% Ascorbinsäure (6-OHDA-Tiere)

10 µl physiologische NaCl-Lösung + 0.1% Ascorbinsäure (Kontroll-Tiere)

Die Tiere wurden vom Ende der Operation bis zum Erwachen mit einer Infrarotlampe aus ca. 1 m Entfernung bestrahlt, um sie vor Auskühlung zu schützen. Die ersten 2 Tage nach der Operation wurden sie in Einzelkäfigen auf Zellstoff gehalten und dann zu 3 bis 6 in Käfige mit Sägmehlstreu umgesetzt. 6-OHDA-injizierte Ratten waren weniger aktiv als Kontroll-Tiere. Sie zeigten aber auf Berührungsreize übersteigerte Aggressivität, die bis zur Selbstverstümmelung (Durchbeißen der Unterlippe) führen konnte. NaCl-injizierte Kontroll-Tiere konnten normal gehandhabt werden.

3.5. Röntgenbestrahlung von neugeborenen Ratten

Um die für eine eventuelle IMI- bzw. Lithium-Wirkung im Cerebellum von Ratten interessanten Purkinje-Zellen anzureichern, sollten neugeborene Ratten entsprechend der Methode von Altman et al. (7) in der Modifikation von Bayer und Peters (11) bestrahlt werden.

3.5.1. Linac-Bestrahlung

Die Methode von Altman mußte modifiziert werden, da im medizinischen Strahleninstitut der Universität Tübingen nur ein 8 MeV Linearbeschleuniger zur Verfügung stand, wohingegen Altman für seine Arbeiten ein 300 keV Röntgengerät benutzt, das ca. 46 R/min abgibt, während der Linearbeschleuniger ca. 400 R/min abgibt. Die Abschirmung der sehr viel härteren Strahlung ist problematischer. Es wurde mit dem Gerät ein 10 mm Spalt ausgeblendet und die Feinabschirmung mit 10 cm dicken Bleiblöcken vorgenommen. Durch 10 cm Blei gehen noch ca. 5% der Strahlung durch. Außerdem wurde mit 2 cm Plexiglas gefiltert, da das Wirkungsoptimum so harter Röntgenstrahlung in 2 cm Tiefe bei Material der Dichte von Wasser liegt. Durch diese apparativen Gegebenheiten war es nicht möglich, wie Altman und wie Bayer mehrere Tiere gleichzeitig zu bestrahlen, sondern es mußte ein Tier nach dem anderen bestrahlt werden. Die Bestrahlung nahm je Tier - einschließlich Fixieren des Tieres in der Plexiglashalterung - ca. 1.5 min in Anspruch. Je nach Anzahl der zu bestrahlenden Tiere betrug die Gesamtzeit, die die Tiere ohne ihre Mütter waren, 1 - 2 h, was eine nicht unerhebliche zusätzliche Belastung für die Tiere bedeutet.

3.5.1.1. Bestrahlung von Sprague-Dawley-Ratten

Im Gegensatz zu Altman, der Ratten vom Long-Evans-Stamm für seine Versuche verwendet, arbeiten wir üblicherweise mit Sprague-Dawley-Ratten. Es wurden deshalb zunächst neugeborene Tiere von diesem Stamm bestrahlt.

Ausgehend von dem Bestrahlungsplan von Altman (7), wurde die Dosis und die Feldgröße variiert, um die für unseren Rattenstamm optimale Bestrahlungsform zu finden. Es wurden in sechs Versuchsreihen insgesamt 220 Jung-

tiere bestrahlt. Die Bestrahlungspläne und -ergebnisse sind in Tabelle 3.2. im Einzelnen wiedergegeben.

Es stellte sich heraus, daß die Jungtiere von diesem Rattenstamm erst bei höheren Strahlendosen, als Altman (6) angibt, Schäden im Cerebellum zeigen. Die Tiere hatten aber auch eine viel höhere Sterblichkeitsrate, als Altman sie angibt (50 - 100% starben vor dem 30. Lebenstag). Die Sterblichkeitsrate korrelierte aber nicht mit der Strahlendosis. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß unter unseren Bestrahlungsbedingungen die optimale Wirkdosis für Sprague-Dawley-Ratten zu nahe bei der mittleren tödlichen Dosis liegt. Die Versuche mit diesem Stamm wurden deshalb abgebrochen.

3.5.1.2. Bestrahlung von Long-Evans-Ratten

Es wurden weitere Versuche mit Long-Evans-Ratten - dem Stamm, den Altman für seine Untersuchungen benutzt - durchgeführt. Insgesamt wurden 111 Jungtiere bestrahlt. In Tabelle 3.2. sind die Bestrahlungspläne und -ergebnisse wiedergegeben.

Da auch diese Ratten eine hohe, von der Strahlendosis unabhängige Sterblichkeit aufwiesen, wurde versucht, mögliche andere Stressfaktoren auszuschalten. So wurden z.B. die Tiere in der Zeit, die sie von ihrer Mutter getrennt waren, mit einer Infrarotlampe gewärmt. Aber auch solche Bemühungen führten nicht zum Erfolg.

Da bei unserer Versuchsanordnung das Problem der Abschirmung offensichtlich so groß ist, daß kein befriedigendes Ergebnis erzielt bzw. reproduziert werden kann, wurden die Versuche an dieser Stelle abgebrochen.

Die Rattenbestrahlung wurde mit Hilfe eines DAAD-Stipendiums an der University of Texas in Dallas im Laboratorium von Dr. D.J. Woodward fortgesetzt.

Tabelle 3.2. Behandlung neugeborener Ratten mit Röntgenstrahlen

Tiere	Dosis-leistung	Feldgröße in mm	Tag	Dosis in R	Ergebnis
Sprague-Dawley 22 m, 14 f	400 R/min	8 Ø rund	0,1 3,5,7,9, 11,13	200 150	keine Veränderungen
Sprague-Dawley 12 m, 12 f	400 R/min	8 Ø rund 10 × 30 30 × 30	0,1 3,5,7,9, 11,13	200 - 600 150 - 450	eckige Felder: alle Tiere † oder ohne Schäden; rundes Feld 1. Dosis 600 R: 85% †, Körnerzellen stark reduziert
Sprague-Dawley 8 m, 8 f	400 R/min	8 Ø rund 10 × 30 30 × 30	1 - 10	200 - 400	alle Tiere †
Sprague-Dawley 20 m, 12 f	100 R/min - 400 R/min	10 × 10 8 × 25	0,1 3,5,7,9, 11,13	200 - 300 150 - 225	alle Tiere †
Sprague-Dawley 48 m	400 R/min	8 × 25	0,1 3,5,7,9, 11,13	150 - 300 113 - 225	1. Dosis < 250 R: keine Schäden, 50% †; 1. Dosis > 250 R: 85% †, Körnerzellen stark reduziert

Sprague-Dawley 40 m	400 R/min	10 × 30	0,1 3,5,7,9, 11,13	200 - 300 100 - 225	alle Tiere † oder ohne Schäden
Sprague-Dawley 24 m	400 R/min	10 × 30	0,1 3,5,7,9, 11,13	200 - 300 75 - 150	alle Tiere † oder ohne Schäden
Long-Evans 42 m	400 R/min	10 × 30	0,1 3,5,7,9, 11,13	200 - 360 125 - 270	1. Dosis < 240 R: alle Tiere † 1. Dosis > 240 R: keine Schäden 240 R/160 R: 50% †, Körnerzellen stark reduziert
Long-Evans 30 m	400 R/min	10 × 30	0,1 3,5,7,9, 11,13	200 - 260 125 - 175	alle Tiere † oder ohne Schäden
Long-Evans 20 m	400 R/min	10 × 30	0,1 3,5,13 7,9,11	200 - 260 150 - 195 100 - 130	alle Tiere †
Long-Evans 19 m	400 R/min	10 × 30	0,1 4,6,9 11,13	240 - 270 120 - 140 180 - 210	abgebrochen, alle Tiere †

3.5.2. Maxitron-Bestrahlung

Die Arbeitsgruppe von Dr. Woodward hat freien Zugang zu einem 300 keV Röntgengerät und bestrahlt die Tiere in der von Altman et al. (7) ursprünglich beschriebenen Anordnung, allerdings mit einem etwas abgewandelten Dosisschema.

Die Tiere wurden in ein Stück Kunststoffolie (ca. 7 × 11 cm) aufgerollt und mit Klebeband fixiert. Die so immobilisierten Tiere wurden in die Bohrungen eines Plexiglasblocks gesteckt (vgl. 3.5.3.2.). Auf dem Plexiglasblock waren zwei 2 cm dicke Bleiplatten, deren vordere verschiebbar war, so daß die Spaltbreite zwischen den Platten variiert und damit dem Wachstum der Tiere angepaßt werden konnte (4 - 10 mm). Die Tiere wurden so weit in die Bohrungen geschoben, daß die Verbindungslinie zwischen den Ohren mit der Hinterkante des vorderen Bleiblocks abschloß. Je nach Größe der Tiere kamen Plexiglasblöcke mit verschieden großen Bohrungen zum Einsatz und wurden 7 - 4 Tiere gleichzeitig bestrahlt. Die Energie der Strahlung betrug 250 keV. Sie wurde mit 2 mm Kupfer gefiltert. Die verabreichte Dosis war an den Tagen 0 und 1 je 200 R, an den Tagen 3 und 5 je 250 R und an den Tagen 7, 9, 11 und 13 je 200 R. Die Dosisleistung des verwendeten Geräts war 93 R/min.

In einer ersten Versuchsreihe wurden 250 Jungtiere (Wistar-Stamm) bestrahlt. Die Tiere zeigten alle einen Strahlenschaden, regenerierten den Defekt aber im Verlauf der 3. bis 6. Lebenswoche vollständig. Die Ursache war eine Verschiebung der Dosisleistung des Röntgengeräts während einer längeren Zeit der Nichtbenutzung.

Nachdem das Gerät neu kalibriert war, wurden 90 Jungtiere (Sprague-Dawley-Stamm) bestrahlt. Diese Tiere zeigten einen schweren Strahlenschaden und erholten sich

nicht davon. Etwa 10% der Tiere starben während der ersten sechs Lebenswochen. 28 m Tiere überlebten und waren zu Versuchen brauchbar. Diese Tiere wurden mit dem Flugzeug nach Deutschland geschickt und nach einer Eingewöhnungszeit von 10 Tagen (7 h Zeitverschiebung, neue Umgebung) mit IMI oder LiCl behandelt. Das Cerebellumgewicht dieser Tiere war signifikant niedriger als bei unbestrahlten Ratten gleichen Körpergewichts, wie aus Tabelle 3.3. hervorgeht.

Tabelle 3.3. Körper- und Cerebellumgewicht bestrahlter und unbestrahlter Ratten

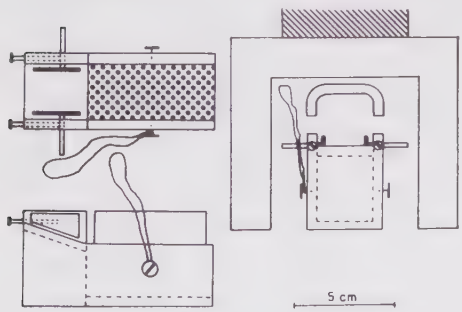
	Körpergewicht	Cerebellumgewicht
bestrahlt	253 ± 7.2 g	73 ± 1.5 mg * (28)
unbestrahlt	261 ± 6.8 g	278 ± 0.9 mg * (28)

* ≙ 2 $p < 0.001$

3.5.3. Baupläne der Halter für die Jungtiere

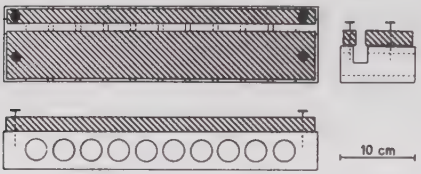
3.5.3.1. Modell für Linac (Einzelbestrahlung)

Die Apparatur ist aus Plexiglas. Die gepunktete Fläche stellt eine Schaumstoffeinlage dar. Der schraffiert gezeichnete Bleiblock ist in Wirklichkeit 10 cm hoch.



3.5.3.2. Modell für Maxitron (Gruppenbestrahlung)

Die Zeichnung gibt eine von drei gleichartigen Apparaturen wieder. Die Bleiplatten sind schraffiert gezeichnet. Die Anzahl und Größe der Bohrungen ist je nach Alter der Tiere unterschiedlich.



3.6. Präparation der Gehirnteile

Die Tiere wurden gewogen und durch Dekapitation getötet. Die Schädeldecke wurde mit einer Schere entlang der Pfeil- und der Lambdanaht aufgeschnitten, die Schläfenbeine, Stirn- und Hinterhauptsbeinhälften zurückgeklappt und das Gehirn entnommen. Das Gehirn wurde in eiskaltem Krebs-Ringer-Puffer gewaschen. Bei mit Lithium vorbehandelten Tieren wurde das Blut aufgefangen, um die Li^+-Spiegel im Serum zu bestimmen.

Das Gehirn wurde auf einem Stück Aluminiumfolie mit Hilfe einer Rasierklinge und zweier Irispinzetten weiterpräpariert.

Das Kleinhirn wurde, indem die Pedunculi cerebelli durchtrennt wurden, herausgelöst und von oberflächlicher weißer Substanz befreit.

Zur Präparation der Großhirnrinde wurde das restliche Gehirn durch einen Längsschnitt in die zwei Hemisphären zerlegt. Die verschiedenen Gehirnstrukturen wurden von innen abgehoben und schließlich die myelinreiche weiße

Corpus callosum-Schicht abgezogen.

Der Hippocampus wurde analog zur Cortex cerebri präpariert. Der Hippocampus erscheint als nach innen gekehrter Teil der Großhirnrinde, gehört aber funktionell zum limbischen System.

Das Corpus striatum besteht aus dem Nucleus caudatus und dem Putamen des Nucleus lentiformis. Es wurde gemäß Glowinski und Iversen (36) präpariert. Das Gehirn wurde durch einen Frontalschnitt in Höhe der Sehnervenkreuzung geteilt und aus dem vorderen Teil der Streifenkörper vorsichtig herausgelöst, indem mit einer scharfen Irispinzette zwischen Großhirnrinde und Streifenkörper gefahren wurde.

3.7. Inkubation der Gehirnschnitte

Das jeweilige Gehirnteil wurde auf einem Gewebeschneider in 260 µm dicke Scheiben geschnitten und diese in ein Becherglas mit ca. 30 ml 37°C warmem, mit Carbogen belüftetem Krebs-Ringer-Puffer überführt.

Nach 10 min Inkubation wurde der überstehende Puffer abgesaugt. Die Schnitte wurden durch mehrmaliges, vorsichtiges Aufsaugen und Wiederausstossen mit einer Pasteurpipette mit abgeschnittener Spitze (lichte Weite ca. 2 mm) getrennt, zweimal mit 50 ml warmem Krebs-Ringer-Puffer gewaschen, mit 30 ml Krebs-Ringer-Puffer aufgefüllt und 40 min inkubiert. Nach dieser Zeit wurde erneut zweimal gewaschen und nochmals 10 min inkubiert. Dann wurde der überstehende Puffer abgesaugt und die Schnitte mit einer Pasteurpipette (wie oben) in die Reaktionsgefäße überführt.

Als Reaktionsgefäße dienten Zentrifugengläser mit

rundem Boden, die 1.8 ml Krebs-Ringer-Puffer und 0.2 ml 6 mM Ascorbinsäurelösung (basal) oder 0.2 ml NA (DA) in 6 mM Ascorbinsäurelösung (stimuliert) enthielten. Die Konzentration von NA (DA) ist beim jeweiligen Versuch angegeben. Die Reaktionsgefäße wurden 5 min bei 37°C vorgewärmt, mit 4 - 5 Tropfen der Gehirnschnittsuspension versetzt, kräftig mit Carbogen begast (bis alle Luft verdrängt ist), mit Parafilm luftdicht verschlossen und 10 min bei 37°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1.0 ml eiskalter 0.4 N $HClO_4$, sofortiges kräftiges Schütteln und Einstellen in Eis gestoppt. Nach Beendigung aller Inkubationen wurden alle Reaktionsgefäße mit 1.0 nCi ^{14}C-cAMP versetzt, nochmals geschüttelt und scharf abzentrifugiert. Überstand und Sediment wurden getrennt weiterverarbeitet (vgl. 3.8. bis 3.10.).

3.8. Säulenchromatographische Reinigung des cAMP

Der saure Überstand von 3.7. wurde mit Tris neutralisiert (ca. 115 µl 3 M Tris) und auf Ionenaustauschersäulen aufgetragen (Dowex 50 WX 4 200 - 400 mesh, 6 × 40 mm). Die Säulen wurden nach dem Ende des freiwilligen Abtropfens mit 1.0 ml Wasser gewaschen und mit 4.0 ml Wasser eluiert. Das Eluat wurde gefriergetrocknet. Die Säulen wurden mit 1 ml 1 N HCl regeneriert und, nachdem sie mit ca. 30 ml Wasser neutral gewaschen worden waren, wiederverwendet.

Das Lyophilisat wurde in einer definierten, den erwarteten cAMP-Werten angepaßten Menge 0.04 M Acetatpuffer pH 4.0 (0.5 - 1.0 ml) gelöst. Ein Aliquot von jeder Probe (0.3 - 0.8 ml) wurde in Szintillationsgläschen pipettiert, mit 5 ml Bray-Lösung versetzt und im LSC gezählt. Außerdem wurden mindestens zwei ^{14}C-cAMP-Standarde und

zwei Leerwerte gezählt. Die Standarde und die Leerwerte enthielten die gleiche Menge Acetatpuffer wie eine Probe. Die Ausbeute wurde gemäß der Formel

Prozent Ausbeute =

$$\frac{100 \cdot (\text{cpm Probe} - \text{cpm Leerwert}) \cdot \mu\text{l Lösungsvolumen}}{(\text{cpm Standard} - \text{cpm Leerwert}) \cdot \mu\text{l Aliquotvolumen}}$$

berechnet. Sie lag im allgemeinen bei 70 - 90%.

3.9. Quantitative Bestimmung von cAMP

Die Bestimmung von cAMP erfolgte mit dem Isotopen-Verdünnungstest nach Gilman (35).

3.9.1. Prinzip des Gilman-Tests

Der Test beruht auf der Verdrängung der spezifischen Bindung von ^{3}H-cAMP an die regulatorische Untereinheit einer Proteinkinase. Hierzu wird eine stets gleichbleibende Menge ^{3}H-cAMP, die größer als die Sättigungskonzentration des eingesetzten Bindungsproteins ist, zusammen mit einer Probe unbekannten cAMP-Gehalts mit dem Bindungsprotein inkubiert. Je größer die Menge unmarkierten cAMPs ist, desto weniger radioaktives cAMP wird gebunden. Der Protein-cAMP-Komplex wird durch Adsorption an Celluloseacetat-Membranfilter von freier Radioaktivität getrennt und die Menge gebundener Radioaktivität durch LSC ermittelt. Anhand parallel inkubierter Eichkurven ist es möglich, den Gehalt der unbekannten Probe an cAMP zu errechnen.

3.9.2. Durchführung des Gilman-Tests

Folgende Lösungen wurden in Einmalreagenzgläser (PS 3 ml) pipettiert:

Standardkurve:

"Mix"	cAMP-Lösung (0.5 pmol/µl)	Wasser	gesamte cAMP-Menge
20 µl	0 µl	20 µl	0.8 pmol
20 µl	1 µl	19 µl	1.3 pmol
20 µl	2 µl	18 µl	1.8 pmol
20 µl	4 µl	16 µl	2.8 pmol
20 µl	8 µl	12 µl	4.8 pmol
20 µl	10 µl	10 µl	5.8 pmol
20 µl	15 µl	5 µl	8.3 pmol
20 µl	20 µl	0 µl	10.8 pmol

Proben:

"Mix"	Probelösung	Wasser	gesamte cAMP-Menge
20 µl	10 µl	10 µl	?
20 µl	20 µl	0 µl	?

Der "Mix" besteht aus 125 mM Acetatpuffer pH 4.0 und soviel ^{3}H-cAMP, daß in 20 µl 0.8 pmol ^{3}H-cAMP enthalten sind.

Nach dem Abkühlen der Teströhrchen im Eisbad wurden alle Gläschen mit der gleichen Menge Bindungsprotein (7 µl ≙ 6 µg) versetzt und über Nacht (12 - 15 h) bei 0°C inkubiert. Die Bindungsproteinmenge ist so gewählt, daß das Protein mit 0.8 pmol ^{3}H-cAMP gerade gesättigt ist. Je Testreihe wurden außerdem zwei Ansätze mit hitzedenaturiertem Bindungsprotein als Leerwert inkubiert.

Die Testansätze wurden nach der Inkubation mit 0.8 ml 20 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6.0 verdünnt, das gesamte

Volumen durch mit Kaliumphosphatpuffer gewaschene Celluloseacetat-Membranfilter abgesaugt und mit 4 ml Kaliumphosphatpuffer nachgewaschen (alles bei 0°C). Die Filter wurden in Szintillationsgefäße gelegt, im Trockenschrank bei 80°C 1 h getrocknet, mit 5 ml Toluol-Szintillator aufgelöst und im LSC gezählt. Je Testreihe wurden mindestens vier Eichkurven parallel inkubiert. Die Eichkurven wurden auf doppellogarithmisches Papier aufgetragen (cpm-Werte gegen Gesamtmenge cAMP). In Abbildung 3.1. ist eine typische Eichgerade wiedergegeben.

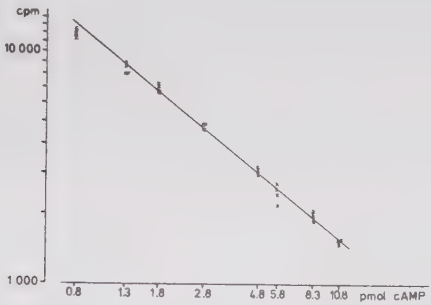


Abbildung 3.1. Eichgerade für Gilman-Test

Die Berechnung der Eichgerade erfolgt mit einem doppellogarithmischen Regressionsprogramm auf einem programmierbaren Taschenrechner unter Auslassung offensichtlicher Ausreisser.

Der Berechnung der unbekannten cAMP-Konzentration liegt die Freundlichsche Adsorptionsisotherme

$$\log cpm = m \cdot \log x + Konst.$$

zugrunde. Die cpm-Werte erhält man aus dem Bindungstest; m und die Konstante können aus der Eichgeraden berechnet werden.

3.10. Proteinbestimmung

Das Sediment von 3.7. wurde in 1 ml Natrium-Desoxycholat-Lösung (2.5% in 0.5 N NaOH) für die Proteinbestimmung mit der Biuret-Methode, bzw. in 1 ml 1 N NaOH für die Lowry-Methode gelöst. Die Lösung wurde mit einer Pasteurpipette in ein tariertes Einmalreagenzglas (PS 3 ml) überführt und das Zentrifugenglas mit ca. 0.5 ml Wasser nachgespült. Die vereinigten Lösungen wurden gewogen und bis zur Proteinbestimmung verschlossen bei 0°C aufbewahrt.

Je nach erwarteter Proteinmenge wurde die Bestimmung nach der Biuret-Methode (> 3 mg Protein) oder nach der Lowry-Methode (< 3 mg Protein) ausgeführt, wobei für einen abgeschlossenen Versuch jeweils nur eine Methode Verwendung fand.

3.10.1. Biuret-Methode

300 µl und 600 µl Probenlösung wurden mit Wasser zu 2.5 ml verdünnt, mit 2.5 ml Biuret-Reagenz versetzt, umgeschüttelt und nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur die Extinktion der Lösung bei 546 nm gegen einen Reagenzienleerwert bestimmt. Die Umrechnung der Extinktionswerte erfolgte unter Einbeziehung des Gesamtvolumens der Probenlösung "G" und eines aus Eichkurven ermittelten Faktors "F = 16.5" gemäß folgender Formel:

$$\text{mg Protein} = \frac{(E_{0.3} + E_{0.6}) \cdot 16.5 \cdot G}{0.9}$$

3.10.2. Lowry-Methode

Die Bestimmung wurde modifiziert nach Lowry (53) durchgeführt.

50 µl und 100 µl Probenlösung wurden mit Wasser zu 500 µl verdünnt, mit 5,0 ml alkalischem Cu-Reagenz versetzt, umgeschüttelt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0.5 ml Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz (1 : 2 mit Wasser verdünnt) wurde sofort umgeschüttelt und nach weiteren 30 min Inkubation bei Raumtemperatur die Extinktion bei 720 nm gegen einen Reagenzienleerwert gemessen. Parallel wurden jeweils eine bis zwei Eichkurven mit 30 - 120 µg BSA/Probe gemessen.

Die Berechnung der Proteinmenge erfolgte mit Hilfe eines linearen Regressionsprogramms auf einem programmierbaren Taschenrechner.

3.11. Präparation der zellfreien AC

Die Präparation erfolgte nach der von du Moulin (63) beschriebenen Methode.

Die Gehirnteile wurden in 5 ml Puffer (48 mM Tris-HCl pH 7.4, 12 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EGTA) in einem Glashomogenisator bei 0°C homogenisiert (5 Schläge A-Stempel + 20 Schläge B-Stempel) und das Homogenisat bei 1 100 × g 15 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml 1 mM $KHCO_3$-Lösung resuspendiert und bei 12 000 × g 20 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml 1 mM $KHCO_3$-Lösung durch 10 Homogenisatorschläge fein suspendiert. Der Proteingehalt der Suspension wurde nach Lowry (53) bestimmt und auf 7 mg/ml Suspension mit 1 mM $KHCO_3$-Lösung eingestellt.

3.12. Test der zellfreien AC

Die Aktivität der AC wurde modifiziert nach du Moulin (63) und Salomon et al. (76) bestimmt.

Das Inkubationsvolumen betrug insgesamt 280 µl und enthielt 40 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM $MgCl_2$, 110 µM $CaCl_2$, 1 mM IBMX, 0.1 mM EGTA, 14 mM Kreatinphosphat, 70 EU Kreatinkinase und 140 µg Protein. Zusätze wie NA und DA sind beim jeweiligen Versuch angegeben. Nach einer Vorinkubation von 5 min bei 37°C wurde durch Zugabe des Substrats 20 µl ATP-Lösung (Endkonzentration 250 µM + 0.5 µCi ^{32}P-ATP je Inkubationsansatz) die Reaktion gestartet. Nach 6 min Inkubation bei 37°C wurde sie durch Zugabe von 100 µl "Stoppuffer" (1.9% SDS in 190 mM Tris-HCl pH 7.6, 3.8 mM cAMP, 3.8 mM ATP und 30 nCi ^{3}H-cAMP/100 µl), Umschütteln und Einstellen in ein Eisbad beendet. Nach mindestens 10 min in Eis wurden jedem Inkubationsansatz 0.8 ml Wasser zugesetzt und der gesamte Ansatz auf eine Ionenaustauschersäule (Dowex 50 WX 8 200 - 400 mesh, 6 × 35 mm) gegeben. Die Säule wurde mit 2 ml Wasser gewaschen und mit 2.5 ml Wasser eluiert. Das Eluat wurde direkt auf eine mit 8 ml 0.1 M Imidazolpuffer pH 7.5 equilibrierte Aluminiumoxidsäule geleitet (Al_2O_3 basisch 90 aktiv, 6 × 30 mm) und diese, nach dem Ende des freiwilligen Abtropfens, mit 4 ml Imidazolpuffer direkt in Szintillationsgefäße eluiert. Das Eluat wurde mit 10 ml Bray-Lösung versetzt und im LSC mit einem Programm, das ^{3}H und ^{32}P nebeneinander erfaßt, gezählt. Bei jedem Versuch wurden 4 Leerwerte mit gekochtem Protein angefertigt. Außerdem wurden je zweimal 100 µl "Stoppuffer" (als ^{3}H-Standard) und 20 µl "Startlösung" (als ^{32}P-Standard) mit 4 ml Imidazolpuffer und 10 ml Bray-Lösung gezählt.

Unter Berücksichtigung der Ausbeute und des Leerwerts wurden die cpm-Werte in pmol cAMP/mg Protein • min gemäß folgender Formel umgerechnet:

$$\text{pmol cAMP/mg Protein} \cdot \text{min} = \frac{\left(\frac{^{32}\text{P-cpm} \cdot \text{cpm } ^3\text{H-Standard}}{^3\text{H-cpm}} - \text{cpm Leerwert} \right) \cdot \text{pmol ATP}}{\text{cpm } ^{32}\text{P-Standard} \cdot \text{Inkubationszeit} \cdot \text{mg Protein}}$$

3.13. Präparation der PDE

Die Präparation der membranständigen PDE entsprach der AC-Präparation von 3.11.. Zur Präparation der löslichen PDE wurde der Überstand des ersten Zentrifugationsschrittes der AC-Präparation 20 min bei 20 000 × g zentrifugiert und der klare Überstand im Test eingesetzt. Der Proteingehalt beider Präparationen wurde nach Lowry (53) bestimmt und auf 6 mg/ml (membranständige PDE) bzw. 2 mg/ml (lösliche PDE) eingestellt.

3.14. Test der PDE-Aktivität

Der Test der PDE-Aktivität wurde nach Pöch (70) durchgeführt.

In einem Inkubationsvolumen von 500 µl waren folgende Endkonzentrationen: 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 3 mM $MgSO_4$, 100 µM $CaCl_2$, 1 mM AMP, 100 µM cAMP + 60 nCi ^{3}H-cAMP und 100 µg bzw. 300 µg Protein. Das AMP schützt das Reaktionsprodukt vor Nukleotidasen im Testansatz. Bis zu einer Konzentration von 10 mM ist keine Produkthemmung feststellbar.

Nach einer Vorinkubation von 10 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrats gestartet und nach 3 min Inkubation bei 37°C durch Zugabe von 0.2 ml $ZnSO_4$-Lösung (ca. 0.2 M) und Einstellen in Eis beendet. Nach 10 min in Eis wurde das Reaktionsprodukt (AMP) durch Zugabe von 0.2 ml BaOH-Lösung (ca. 0.2 M) gefällt und die Suspension zentrifugiert. Vom klaren Überstand wurden 600 µl in Szintillationsgläschen pipettiert, mit 5 ml Bray-Lösung versetzt und die Radioaktivitätsmenge mit LSC bestimmt.

Als Standard für die Gesamtradioaktivitätsmenge dient

ein Inkubationsansatz mit hitzedenaturiertem Protein. Die $ZnSO_4$- und die BaOH-Lösung sind so gegeneinander eingestellt, daß gleiche Volumina beider Lösungen gemischt mit Phenolphthalein eine gerade sichtbare Rosafärbung geben. Das entstehende $BaSO_4$ reißt alle nichtzyklischen Nukleotide in den Niederschlag, nur cAMP und eventuell Adenosin verbleiben im Überstand und werden bei der LSC erfaßt.

3.15. Serotoninbindungstest

Der Test wurde modifiziert nach Peroutka und Snyder (68) ausgeführt.

3.15.1. Durchführung des Tests

Das zu untersuchende Hirnteil wurde gewogen und in 10 Teilen eiskalter 0.32 M Sucroselösung homogenisiert (5 Schläge B-Stempel + 20 Schläge A-Stempel). Die so erhaltene Suspension wurde bei 700 × g 10 min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 10 Teilen 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.7 resuspendiert und 10 min bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde bei 48 000 × g 10 min zentrifugiert und der Niederschlag in soviel Inkubationspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.7, 4 mM $CaCl_2$, 0,1% Ascorbinsäure) resuspendiert, daß 0.8 ml Suspension 10 mg Hirnfeuchtgewicht entsprachen. Die endgültige Suspension wurde bei 37°C 15 min inkubiert, nochmals fein homogenisiert und bis zur Verwendung (maximal 4 h) in Eis aufbewahrt. Der Proteingehalt der Suspension wurde nach Beendigung des Versuchs nach Lowry (53) bestimmt.

Der Inkubationsansatz bestand aus: 0.8 ml Proteinsuspension, 0.1 ml Wasser oder 50 µM 5-HT-Lösung oder anderem Zusatz und 0.1 ml ^{3}H-5-HT-Lösung.

Die Inkubation wurde nach 5 min Vorinkubation bei 21°C mit ^{3}H-5-HT gestartet und nach weiteren 5 min durch Absaugen durch Whatman GF/B-Filter und dreimaliges Nachwaschen mit je 5 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.7 gestoppt. Die Filter wurden bei 80°C 1 h getrocknet und mit 5 ml Toluol-Szintillator im LSC gezählt. Von jeder verwendeten ^{3}H-5-HT-Verdünnung wurden als Standard 0.1 ml auf ein Filter pipettiert, getrocknet und gezählt.

Die spezifisch gebundene 5-HT-Menge wird als Differenz der Proben mit und ohne unmarkiertem 5-HT berechnet.

3.15.2. Einfluß von Tiefgefrieren der Gehirne auf die ^{3}H-5-HT-Bindung

Da verschiedentlich in der Literatur berichtet wird, daß tiefgefrorene Hirne für die Bindungsstudien verwendet wurden, wurde die Wirkung von Einfrieren und Lagern bei -80°C auf die ^{3}H-5-HT-Bindung untersucht.

Das zu untersuchende Hirnteil wurde präpariert. Die Hälfte davon wurde dann gemäß 3.15.1. homogenisiert und auf Bindungsaktivität getestet; die andere Hälfte wurde mit Trockeneis oder flüssigem Stickstoff eingefroren und 6 Tage in dicht verschlossenen Gefäßen bei -80°C aufbewahrt. Am 7. Tag wurden diese Hirnhälften aufgetaut und ebenfalls gemäß 3.15.1. getestet.

In Tabelle 3.4. ist das Ergebnis wiedergegeben. Da es sich hier nur um einen rein qualitativen Vergleich zweier Methoden handelt, wurde auf eine Umrechnung der cpm-Werte in fmol 5-HT/mg Protein verzichtet. Die eingesetzte 5-HT-Konzentration war einheitlich 2 nM.

Tabelle 3.4. Einfluß von Einfrieren auf die 5-HT-Bindung

Angaben in cpm spez. gebunden/mg Protein

	frisch	tiefgefroren
Cortex cerebri	840 ± 140 (4)	870 ± 130 (4)
Corpus striatum	1145 ± 90 (4)	1090 ± 210 (4)
Hippocampus	1575 ± 265 (4)	1235 ± 180 (4)

Die 5-HT-Bindung wurde in keinem der untersuchten Gehirnteile durch das Einfrieren und Lagern bei -80°C signifikant beeinflußt, wenn auch im Hippocampus eine Tendenz zur Senkung der Bindungsaktivität zu beobachten ist. Die Untersuchungen wurden trotzdem alle stets mit frischen Gehirnteilen durchgeführt, da hierbei der Anteil der unspezifischen Bindung an der gesamten Bindung um ca. 10 - 20% geringer war.

3.16. Dihydroalprenololbindungstest

Der Test wurde modifiziert nach Bylund und Snyder (17) ausgeführt.

3.16.1. Durchführung des Tests

Es wurde nach 3.11. eine AC-Präparation hergestellt mit der Änderung, daß nach dem zweiten Zentrifugationsschritt nicht in 1 mM $KHCO_3$-Lösung homogenisiert wurde, sondern in 5 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8.0. Der Proteingehalt der Suspension wurde nach Lowry (53) bestimmt und mit dem gleichen Puffer auf 2 mg/ml eingestellt. Der Inkubationsansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 ml 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.7 - 10.0 nM ^{3}H-DHA und 1 mg Protein. Die Ansätze zur Bestimmung der unspezifischen Bin-

dung enthielten zusätzlich 10 µM Prop-HCl.

Nach 5 min Vorinkubation bei 22°C wurde die Inkubation durch Zugabe des radioaktiven DHA gestartet und nach 20 min durch Zugabe von 5 ml eiskaltem Puffer und rasches Absaugen durch Whatman GF/B-Filter beendet. Die Filter wurden zweimal mit 5 ml eiskaltem Puffer gewaschen, bei 80°C 1 h getrocknet und die an das Filter gebundene Radioaktivitätsmenge nach Zugabe von 5 ml Toluolszintillator mit LSC bestimmt.

Die spezifisch an die ß-adrenergen Rezeptoren gebundene DHA-Menge wurde als Differenz der Proben mit und ohne Prop berechnet. Von jeder verwendeten DHA-Konzentration wurden 100 µl auf ein Filter pipettiert, getrocknet und gezählt. Die so erhaltenen Standardwerte dienten als Bezugspunkte zur Umrechnung von cpm-Werten in fmol DHA.

Alle Inkubationen und Verdünnungen wurden in PPN-Einweggefäßen durchgeführt, die in Vorversuchen (3.16.2.) die geringste Adsorptionsrate zeigten.

3.16.2. Wahl der Inkubationsgefäße

Da der DHA-Bindungstest mit Stoffkonzentrationen im nanomolaren Bereich durchgeführt wird, ist je nach Beschaffenheit der Gefäßwand mit einem mehr oder weniger gravierenden Adsorptionsverlust zu rechnen. Das heißt, die tatsächliche Endkonzentration ist stets kleiner als die berechnete. Dies macht sich besonders negativ beim Herstellen der Verdünnungsreihe des radioaktiven Liganden bemerkbar, zumal wenn eine Verdünnungsstufe in mehreren Schritten bereitet wird. Hierbei wird der Adsorptionsverlust mit zunehmender Anzahl der Verdünnungsschritte immer größer, so daß es zu einer Verzerrung der Konzen-

trationsverhältnisse kommt. Das Ergebnis von Verdünnungsversuchen in verschiedenen Gefäßen ist in Tabelle 3.5. wiedergegeben.

Tabelle 3.5. Verdünnungsversuch zur Ermittlung des Adsorptionsverlusts

Angaben in cpm-Werten (auf 100er gerundet)

	theoretisch	praktisch			
		schrittweise		direkt	
		PS	PPN	PS	PPN
Stammlösung	40 000	36 600	39 900	36 500	40 100
Verdünnung 1 : 2	20 000	13 700	18 100	13 900	18 200
Verdünnung 1 : 4	10 000	5 000	7 900	6 900	9 200

Werden alle verwendeten Konzentrationen in nur einem Verdünnungsschritt aus der selben Stammlösung hergestellt, so weisen alle den gleichen prozentualen Adsorptionsverlust auf. Alle Verdünnungen haben dann untereinander die richtigen Konzentrationsverhältnisse, weichen aber vom theoretischen Gehalt linear ab. Das Ausmaß der Abweichung kann durch die Wahl der verwendeten Gefäße beeinflußt werden. Es wurden Gefäße aus verschiedenen Materialen getestet, am günstigsten schnitten Gefäße aus PPN ab. PPN adsorbiert weniger als 10% der eingesetzten Radioaktivitätsmenge. Ein "Vorspülen" der Gefäße mit einer gesättigten DHA-Lösung, um unspezifische Bindungsstellen der Gefäßwand abzusättigen, brachte keine weitere Verbesserung.

Es wurden im folgenden alle Bindungsstudien in PPN-Einwegreaktionsgefäßen durchgeführt. Die Verdünnungsreihe des radioaktiven Liganden wurde durch einmaliges Ver-

dünnen einer Stammlösung, die 10% zu stark war, hergestellt.

3.16.3. Einfluß von Tiefgefrieren der Gehirne auf die ^{3}H-DHA-Bindung

Entsprechend 3.15.2. wurde auch für die DHA-Bindung der Einfluß des Einfrierens und Lagerns der Gehirne bei -80°C auf das Bindungsverhalten untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 3.6. dargestellt.

Tabelle 3.6. Einfluß von Einfrieren auf die DHA-Bindung

Angaben in cpm spez. gebunden/mg Protein

		frisch	tiefgefroren
Cortex cerebri	1 nM DHA	1245 ± 145 (4)	905 ± 120 (4)
Corpus striatum	1 nM DHA	750 ± 105 (4)	790 ± 95 (4)
Cerebellum	2 nM DHA	2150 ± 135 (6)	1050 ± 140 (6)*
Cerebellum	4 nM DHA	3085 ± 125 (6)	1150 ± 100 (6)*

* = 2 $p < 0.001$

Im Corpus striatum sind keine Unterschiede im Bindungsverhalten festzustellen. In der Cortex cerebri wird die Bindung etwas erniedrigt. Geradezu dramatisch ist aber der Effekt des Einfrierens auf Bindungskapazität und -verhalten im Cerebellum. Hier geht etwa die Hälfte der Bindungskapazität verloren. Außerdem ändert sich die Konzentrationsabhängigkeit der Bindung. Dies könnte mit der Andersartigkeit der Rezeptorpopulation des Cerebellums zusammenhängen.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß es zumindest für das Cerebellum nötig ist, frisches Gewebe zu untersuchen.

3.17. Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit einem programmierbaren Taschenrechner (HP 65).

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± s.e.m. angegeben. Die Mittelwerte sind normalerweise mit einer, die s.e.m. mit zwei Dezimalstellen mehr angegeben, als für das Einzelergebnis berechnet wurden. Die jeweils letzte Dezimalstelle ist gerundet.

Einzelwerte, die nach dem Ausreissertest nach Nalimov mit 99,9% Wahrscheinlichkeit nicht der Grundgesamtheit angehören, wurden bei der Berechnung nicht berücksichtigt. Dies führt scheinbar zu einer unterschiedlichen Anzahl von Versuchen.

Die Anzahl der Versuche ist in Klammern hinter dem Standardfehler angegeben. Diese Zahl ist jeweils die Anzahl der unabhängig voneinander untersuchten Tiere und nicht die Anzahl der Einzelexperimente (es wurden stets Mehrfachbestimmungen durchgeführt).

Statistische Signifikanzgrenzen wurden - soweit nicht anders vermerkt - mit dem Student's t-Test berechnet.

In Graphiken sind die Werte unbehandelter Tiere bzw. ohne IMI (DMI)-Zusatz mit ausgefüllten Kreisen und durchgezogenen Kurven dargestellt, die Werte behandelter Tiere bzw. mit IMI (DMI)-Zusatz mit offenen Kreisen und durchbrochenen Kurven. Geraden in Graphiken sind nach der Methode der kleinsten Abstandsquadrate (Regressionsgeraden) berechnet.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen am cAMP-System in Schnitten von verschiedenen Gehirnteilen der Ratte

In Fortführung der Arbeiten von Schocker (80) wurden verschiedene Untersuchungen mit Schnitten diverser Gehirnteile ausgeführt. Die Schwerpunkte dieser Untersuchungen lagen auf dem Zusammenhang zwischen täglicher IMI-Dosis und dem Ausmaß der Subsensitivität des NA-empfindlichen cAMP-Systems sowie auf Wechselwirkungen zwischen IMI und 6-OHDA. Ferner wurden Untersuchungen zur NA-Empfindlichkeit des cAMP-Systems nach einer Lithium-Behandlung durchgeführt.

4.1.1. cAMP-Bildung in der Cortex cerebri nach Vorbehandlung der Tiere mit IMI: NA-Stimulation und Einfluß von IBMX und Ascorbinsäure

Ratten wurden mit IMI behandelt, wie in 3.4.1. beschrieben, und die basale sowie die mit 100 µM NA stimulierte cAMP-Bildung in An- und Abwesenheit von 1 mM IBMX gemessen. Diese Kontrollmessungen waren nötig, da alle Schnittinkubationen nach der Methode von Forn et al. (28) ausgeführt wurden, der im Gegensatz zu der seither in unserem Laboratorium benutzten Methode IBMX (als PDE-Hemmer) und Ascorbinsäure (als Antioxidans) im Inkubationsmedium hat. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.1. wiedergegeben.

Tabelle 4.1. Einfluß von IBMX auf die cAMP-Bildung

Angaben in pmol cAMP/mg Protein × 10 min

		Kontrolle	IMI
ohne IBMX	basal	10.8 ± 1.15 (4)	10.4 ± 0.69 (4)
	100 µM NA	36.8 ± 1.73 (4)*	23.4 ± 1.88 (4)*
1 mM IBMX	basal	22.5 ± 1.28 (6)	21.9 ± 1.66 (6)
	100 µM NA	82.3 ± 2.91 (6)**	53.7 ± 3.09 (6)**

* = 2 p < 0.005 ; ** = 2 p < 0.001

Tabelle 4.2. Einfluß von IBMX auf die NA-stimulierte cAMP-Bildung

Angaben in %-Stimulation über Basalwert

	Kontrolle	IMI
ohne IBMX	241.7 ± 16.1 (4)	123.9 ± 18.0 (4)
1 mM IBMX	266.1 ± 13.0 (6)	145.5 ± 14.1 (6)

Wie die Umrechnung der Stimulation der cAMP-Bildung durch 100 µM NA in Prozent über den Basalwert in Tabelle 4.2. zeigt, sind die Ergebnisse mit oder ohne IBMX quantitativ unterschiedlich, entsprechen sich aber qualitativ vollständig. Es entsteht durch die Behandlung der Tiere mit IMI eine Subsensitivität des NA-stimulierten cAMP-Systems von ca. 50%. Die höhere Signifikanz in Anwesenheit von IBMX ist auf die geringere Streuung der Einzelwerte zurückzuführen, die auch in anderen Gehirnteilen in Gegenwart von IBMX zu beobachten ist. Dies ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß IBMX nicht nur die PDE hemmt, sondern auch eine eventuelle Adenosinwirkung antagonisiert.

In einem zweiten Versuch wurde der Einfluß von 600 µM Ascorbinsäure auf die NA-stimulierte AC untersucht. Es zeigte sich, daß es bei der Methode nach Forn (28) - bei der nicht kontinuierlich mit Carbogen begast wird - während der Inkubationszeit zu einer leichten pH-Verschiebung kommen kann, was sich in einer Zersetzung des NA, erkenntlich an der Rotfärbung des Inkubationsmediums, äußert. Die basalen cAMP-Werte waren mit oder ohne Ascorbinsäure nicht unterschiedlich; die mit NA stimulierten Werte schwankten aber ohne Ascorbinsäure so stark, daß statistische Signifikanzschwellen kaum mehr erreicht wurden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Versuche in Anwesenheit von 600 µM Ascorbinsäure und - sofern nicht anders vermerkt - 1 mM IBMX durchgeführt.

4.1.2. Auswirkung unterschiedlicher täglicher IMI-Gaben auf die NA-stimulierte cAMP-Bildung

Sieben Gruppen zu je 6 Tieren wurden 9 Tage lang mit unterschiedlichen Mengen IMI von 1.5 - 50 mg/kg/d behandelt, eine achte Gruppe mit 8 Tieren erhielt kein IMI. Am 10. Tag wurden die Tiere getötet und die basalen und die mit 100 µM NA stimulierten cAMP-Werte in der Cortex cerebri gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.3. und in Abbildung 4.1. wiedergegeben.

Während die basale cAMP-Bildung in allen Gruppen annähernd gleich und von der Kontrollgruppe nicht signifikant verschieden ist, sind die mit 100 µM NA stimulierten cAMP-Werte von der täglichen IMI-Gabe abhängig. Mit steigender täglicher IMI-Dosis nimmt die Stimulierbarkeit der Gehirnschnitte durch NA bis 20 mg IMI/kg/d immer mehr ab und bleibt dann auch bei höherer täglicher IMI-Dosis auf diesem Niveau.

Tabelle 4.3. Einfluß der täglichen IMI-Dosis auf die cAMP-Bildung

Angaben in pmol cAMP/mg Protein × 10 min

	basal	100 µM NA	2 p <
Kontrolle	22.0 ± 1.28	81.9 ± 3.72	
1.5 mg IMI/kg/d	21.2 ± 2.07	79.6 ± 5.66	n.s.
3.0 mg IMI/kg/d	22.1 ± 1.94	69.2 ± 4.04	0.05
6.0 mg IMI/kg/d	20.5 ± 2.48	65.7 ± 2.21	0.005
10.0 mg IMI/kg/d	20.8 ± 0.99	60.8 ± 4.06	0.005
20.0 mg IMI/kg/d	19.5 ± 2.19	53.1 ± 5.19	0.001
30.0 mg IMI/kg/d	21.9 ± 0.68	53.7 ± 3.09	0.001
50.0 mg IMI/kg/d	21.2 ± 2.82	53.8 ± 4.15	0.001

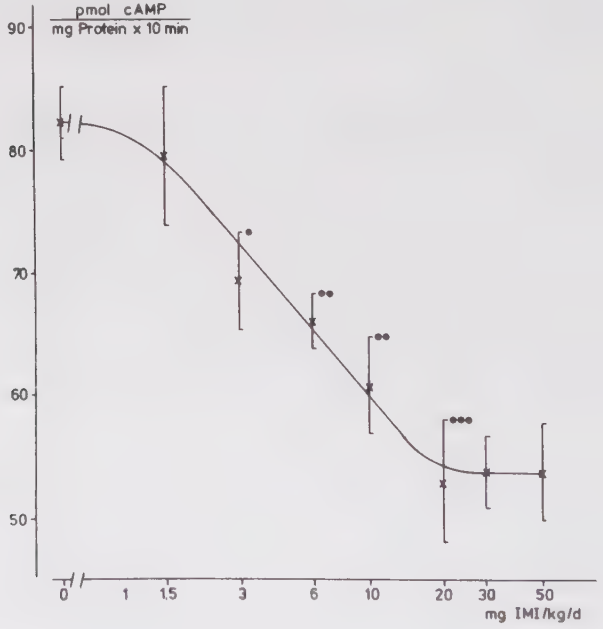


Abbildung 4.1. Einfluß der täglichen IMI-Dosis auf die NA-stimulierte cAMP-Bildung

Trägt man - wie in Abbildung 4.1. geschehen - die cAMP-Werte gegen den Logarithmus der täglichen IMI-Gabe auf, so ergibt sich eine sigmoide Dosis-Wirkungs-Kurve. Bereits ab einer täglichen Gabe von nur 3 mg IMI/kg ist das cAMP-System der Cortex cerebri signifikant weniger gegen NA empfindlich.

Die bei allen anderen Versuchen verwendete Dosierung von 30 mg IMI/kg/d liegt im Bereich maximaler Subsensitivität, ist aber mit Sicherheit weit vom toxischen Bereich entfernt, da auch 50 mg IMI/kg/d von den Tieren ohne sichtbare Nebenwirkungen vertragen wird. Die akute L_D50 ist oral 625 mg IMI/kg.

4.1.3. Einfluß der IMI-Behandlung auf die cAMP-Bildung im Hippocampus und im Corpus striatum

Noradrenerge Neurone kommen nicht nur in der Großhirnrinde vor, sondern sind in fast allen Gehirnregionen anzutreffen. Wie schon Schocker (80) gezeigt hat, ist im Cerebellum eine verminderte Empfindlichkeit der AC gegen NA nach einer IMI-Behandlung andeutungsweise zu sehen, allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Auffallend sind bei diesen Daten die hohen basalen und NA-stimulierten cAMP-Werte. Dies kann sowohl auf den hohen Adenosingehalt des Cerebellums zurückzuführen sein, als auch in einer sehr großen Dichte noradrenerger Neurone begründet sein (vgl. 4.7.).

Die experimentellen Daten, die Schocker für das Corpus striatum angibt, sind weniger einheitlich. Daher wurden diese Experimente von mir nochmals wiederholt.

Das Corpus striatum besteht aus den Großhirnkernen Nucleus caudatus, Putamen und Globus pallidus, die zusammen den Nucleus lentiformis bilden. Diese Kerne werden

Stammganglien genannt. Sie sind wichtige Schaltzentren der extrapyramidalen Motorik und zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an DA, der unmittelbaren biosynthetischen Vorstufe von NA, aus.

Der ebenfalls untersuchte Hippocampus wird zum limbischen System gezählt, das die Stimmungslage und das affektive Verhalten kontrolliert. Am limbischen System sollte der Hauptangriffspunkt der antidepressiven Wirkung von IMI zu erwarten sein.

4.1.3.1. Einfluß der IMI-Behandlung auf die cAMP-Bildung im Corpus striatum

Es wurde bei Kontroll- und IMI-Tieren die basale und die durch 300 µM NA bzw. 1 mM DA stimulierte cAMP-Bildung gemessen. Die hohen Neurotransmitterkonzentrationen wurden in Anlehnung an Forn et al. (28) gewählt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4. dargestellt.

Tabelle 4.4. Einfluß von IMI auf die cAMP-Bildung im Corpus striatum

Angaben in pmol cAMP/mg Protein × 15 min

	Kontrolle	IMI
basal	13.6 ± 0.58 (6)	12.9 ± 1.54 (5)
300 µM NA	38.3 ± 2.64 (6)	35.7 ± 1.74 (5)
1 mM DA	21.4 ± 1.36 (6)	21.1 ± 3.12 (5)

Alle stimulierten Werte liegen hochsignifikant über den Basalwerten ($2\ p < 0.001$), es ergeben sich jedoch keine Unterschiede bezüglich der Stimulierbarkeit mit NA oder DA zwischen Kontroll- und IMI-Tieren. Dies war nach den Ergebnissen aller von Schocker durchgeführten Experimente zu erwarten.

4.1.3.2. Einfluß der IMI-Behandlung auf die cAMP-Bildung im Hippocampus

Wie in der Cortex cerebri wurde im Hippocampus die cAMP-Bildung basal und durch 100 µM NA stimuliert gemessen in An- und Abwesenheit von 1 mM IBMX. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.5. wiedergegeben.

Tabelle 4.5. Einfluß von IMI auf die cAMP-Bildung im Hippocampus

Angaben in pmol cAMP/mg Protein × 10 min

		Kontrolle	IMI
ohne IBMX	basal	8.9 ± 1.16 (6)	8.7 ± 0.59 (6)
	100 µM NA	37.5 ± 2.38 (6)*	26.3 ± 2.62 (6)*
1 mM IBMX	basal	12.0 ± 0.27 (6)	12.5 ± 1.45 (5)
	100 µM NA	57.0 ± 2.31 (6)**	33.4 ± 1.24 (5)**

* = 2 $p < 0.02$; ** = 2 $p < 0.001$

Wie in der Cortex cerebri werden die Basalwerte durch die IMI-Behandlung nicht verändert, wohl aber die mit 100 µM NA stimulierten cAMP-Werte. Analog zur Cortex cerebri liegen die Werte ohne IBMX niederer als mit IBMX und streuen stärker, entsprechen sich aber qualitativ.

4.1.4. Auswirkungen einer kombinierten Behandlung mit 6-OHDA und IMI auf die NA-stimulierten cAMP-Werte in der Cortex cerebri

Die intraventrikuläre Injektion der neurotoxischen Substanz 6-OHDA führt zu einer selektiven Zerstörung noradrenerger präsynaptischer Nervenendigungen (43). Diese

Selektivität beruht darauf, daß 6-OHDA vom NA-Rückaufnahmesystem präsynaptischer Neurone aufgenommen wird, nicht aber von anderen Rückaufnahmesystemen (para-Chloroamphetamin entfaltet auf dopaminerge Neurone eine ähnliche Wirkung (102)).

Tiere wurden, wie in 3.4.1. und 3.4.2. beschrieben, mit 6-OHDA und/oder IMI behandelt. Es wurden sechs verschiedene Behandlungsmuster ausgeführt:

	Behandlung	Injektion	Behandlung
1)	9 Tage H_2O	NaCl	5 Tage H_2O
2)	9 Tage H_2O	6-OHDA	5 Tage H_2O
3)	5 Tage H_2O	6-OHDA	9 Tage H_2O
4)	9 Tage IMI	NaCl	5 Tage IMI
5)	9 Tage IMI	6-OHDA	5 Tage IMI
6)	5 Tage H_2O	6-OHDA	9 Tage IMI

Die Behandlungsdauer betrug insgesamt einheitlich 14 Tage.

Das Ergebnis ist in Tabelle 4.6. und in Abbildung 4.2. dargestellt.

Tabelle 4.6. Einfluß einer kombinierten 6-OHDA/IMI-Behandlung auf die cAMP-Werte in der Cortex cerebri
Angaben in pmol cAMP/mg Protein × 10 min

	basal	100 µM NA
1) Kontrolle/NaCl	21.2 ± 1.73 (6)	64.5 ± 3.27 (6)
2) Kontrolle/6-OHDA	20.0 ± 1.20 (9)	94.1 ± 6.72 (9)*
3) 6-OHDA/Kontrolle	18.6 ± 1.27 (6)	81.8 ± 3.80 (6)*
4) IMI/NaCl	18.1 ± 1.43 (8)	47.9 ± 2.35 (8)**
5) IMI/6-OHDA	17.5 ± 1.11 (8)	44.5 ± 2.47 (8)**
6) 6-OHDA/IMI	19.1 ± 1.21 (6)	84.2 ± 6.34 (6)*

* = signifikant höher als 1) $2p < 0.02$

** = signifikant niederer als 1) $2p < 0.005$

5) und 6) sind signifikant verschieden $2p < 0.001$

Da zwischen den Gruppen 2) und 3) kein signifikanter Unterschied besteht (2 p < 0.1; F = 4.69), wurden sie für die Abbildung zu einer Gruppe zusammengefaßt. Der Mittelwert ± s.e.m. beträgt dann 89.2 ± 4.49 (15). Er liegt signifikant (2 p < 0.005) über dem Mittelwert von Gruppe 1).

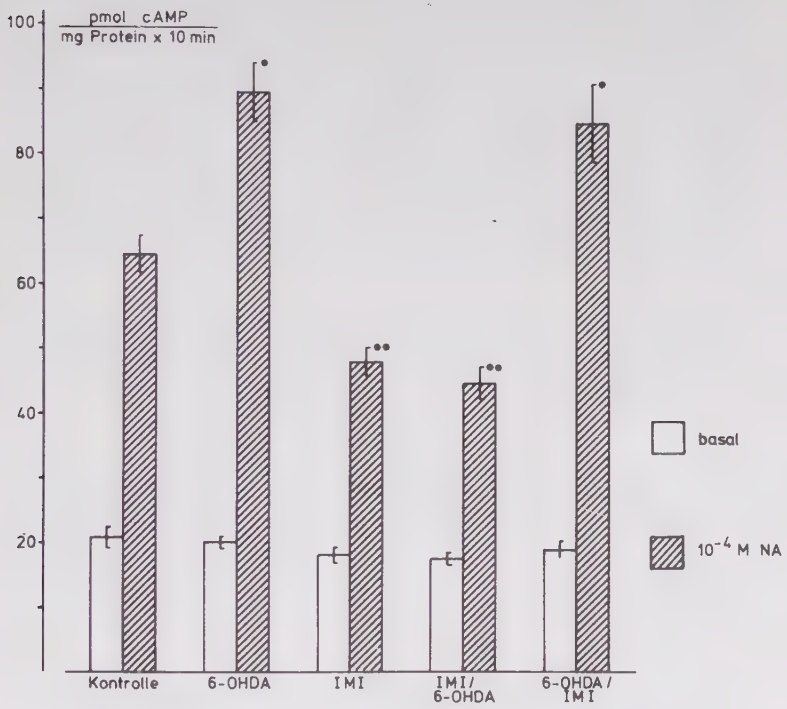


Abbildung 4.2. Einfluß einer kombinierten 6-OHDA/IMI-Behandlung auf die cAMP-Werte in der Cortex cerebri

Dieser Versuch zeigt dreierlei:

1) Die chemische Zerstörung präsynaptischer noradrener-

ger Nervenendigungen führt zu einer erhöhten Sensitivität des postsynaptischen cAMP-Systems. Dies wurde schon von Huang et al. (43) gezeigt.

2) Die Vorbehandlung der Tiere mit IMI verhindert die zerstörende Wirkung von 6-OHDA, was darauf zurückzuführen ist, daß die Aufnahme von 6-OHDA in die präsynaptischen Nervenendigungen durch IMI gehemmt ist. Es kann somit eine Hemmung des NA-Aufnahmesystems in vivo demonstriert werden.

3) Behandlung der 6-OHDA injizierten Tiere mit IMI macht die übersteigerte Empfindlichkeit der postsynaptischen Neurone gegen NA nicht rückgängig. Das heißt, für eine IMI-Wirkung sind intakte präsynaptische Nervenendigungen Voraussetzung.

4.1.5. Wirkung von Antagonisten auf die NA-stimulierte cAMP-Bildung in der Cortex cerebri nach einer IMI-Behandlung

Es wurde versucht, durch Hemmung der NA-stimulierten AC mit α- bzw. β-selektiven NA-Antagonisten Aufschlüsse darüber zu erhalten, ob die geringere Stimulierbarkeit der Schnitte nach einer IMI-Behandlung ein Effekt ist, der auf Veränderungen am α- oder β-adrenergen Rezeptorensystem beruht.

4.1.5.1. Hemmung der NA-stimulierten cAMP-Bildung mit Propranolol

Prop, ein β-selektiver NA-Antagonist, hemmt im Bereich 100 nM - 30 µM die stimulierende Wirkung von NA auf das cAMP-System dosisabhängig. Wie aus den Tabellen 4.7. und 4.8. hervorgeht, sind bezüglich der prozentualen Hemmung keine Unterschiede zwischen Kontroll- und IMI-Tieren festzustellen.

Tabelle 4.7. Hemmung der cAMP-Bildung durch Prop
Angaben in pmol cAMP/mg Protein × 10 min

	Kontrolle (8)	IMI (9)
basal	18.3 ± 1.54	18.2 ± 1.01
100 µM NA	87.2 ± 7.78	63.0 ± 5.26*
100 µM NA + 300 nM Prop	69.2 ± 4.74	52.3 ± 3.61*
100 µM NA + 1 µM Prop	62.4 ± 3.28	46.4 ± 3.62**
100 µM NA + 10 µM Prop	51.6 ± 3.55	37.7 ± 2.66**
100 µM NA + 30 µM Prop	46.6 ± 4.55	38.0 ± 3.37

* = 2 p < 0.02 ; ** = 2 p < 0.01 (verglichen mit den entsprechenden Werten bei Kontroll-Tieren)

Tabelle 4.8. Angaben in Prozent Hemmung (100 µM NA-Wert - Basalwert = 100% Stimulation; Prozent Hemmung = 100 - Prozent Stimulation)

	Kontrolle	IMI
300 nM Prop	26.1 ± 6.9	23.8 ± 8.1
1 µM Prop	36.0 ± 4.8	37.0 ± 8.1
10 µM Prop	51.7 ± 5.2	56.6 ± 5.9
30 µM Prop	58.9 ± 6.6	55.9 ± 7.5

Auffallend ist, daß die Hemmung ca. 55% nicht überschreitet. Diese maximale Hemmwirkung wird mit 30 µM Prop erreicht.

4.1.5.2. Hemmung der NA-stimulierten cAMP-Bildung mit Phentolamin

Phen, ein selektiver Antagonist von α-Adrenozeptoren,

hemmt wie Prop die NA-Stimulation des cAMP-Systems dosisabhängig im Bereich 300 nM - 30 µM. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4.9. und 4.10. dargestellt.

Tabelle 4.9. Hemmung der cAMP-Bildung durch Phen

Angaben in pmol cAMP/mg Protein × 10 min

	Kontrolle (8)	IMI (9)
basal	18.3 ± 1.54	18.2 ± 1.01
100 µM NA	87.2 ± 7.78	63.0 ± 5.26*
100 µM NA + 300 nM Phen	73.2 ± 5.12	54.6 ± 3.81**
100 µM NA + 1 µM Phen	63.8 ± 3.72	47.9 ± 3.32**
100 µM NA + 3 µM Phen	60.7 ± 3.66	44.5 ± 3.99**
100 µM NA + 30 µM Phen	50.5 ± 3.35	40.3 ± 3.39
100 µM NA + 30 µM Phen + 30 µM Prop	20.5 ± 1.98	19.9 ± 1.57

* = 2 p < 0.02 ; ** = 2 p < 0.01 (verglichen mit den entsprechenden Werten bei Kontroll-Tieren)

Tabelle 4.10. Angaben in Prozent Hemmung (wie in Tabelle 4.8.)

	Kontrolle	IMI
300 nM Phen	20.3 ± 7.4	18.8 ± 8.5
1 µM Phen	33.9 ± 5.4	33.6 ± 7.4
3 µM Phen	38.5 ± 5.3	41.3 ± 8.9
30 µM Phen	53.3 ± 4.9	50.7 ± 7.6
30 µM Phen + 30 µM Prop	96.8 ± 2.9	96.3 ± 3.5

Auch bei Phen bestehen keine Unterschiede bezüglich

der prozentualen Hemmung zwischen Kontroll- und IMI-Tieren. Phen hemmt, wie Prop, die NA-Stimulation maximal um ca. 55% bei 30 µM. Eine Kombination von 30 µM Prop und 30 µM Phen ergibt eine nahezu 100%ige Hemmung.

Diese Daten deuten darauf hin, daß bei der NA-Stimulation des cAMP-Systems sowohl α- als auch β- Rezeptoren beteiligt sind. Dies wurde auch schon von Schultz und Daly (82) beschrieben. Ob IMI einen Rezeptortyp bevorzugt beeinflußt, läßt sich aus diesen Daten nicht ablesen. Dies ist der Gegenstand weiterer Untersuchungen (vgl. 4.5.).

4.2. Auswirkungen der Lithium-Behandlung auf die cAMP-Bildung in verschiedenen Gehirnteilen

Li^+-Ionen bewirken eine erhöhte Empfindlichkeit noradrenerger Rezeptoren an den Purkinje-Zellen des Kleinhirns von Ratten (88). Trotz nicht signifikanter Subsensitivität im Cerebellum nach einer IMI-Behandlung, die im elektrophysiologischen Experiment nachweisbar ist, schien es deshalb interessant, verschiedene Gehirnteile nach Behandlung der Tiere mit Lithium hinsichtlich der Stimulierbarkeit des noradrenergen cAMP-Systems zu untersuchen.

4.2.1. Auswirkung der Lithium-Behandlung auf die cAMP-Werte im Corpus striatum

Nach 9 Tagen Behandlung mit LiCl, wie unter 3.4.1. beschrieben, wurden Schnitte des Corpus striatum entsprechend 4.1.3. untersucht. Die Serum-Lithium-Spiegel lagen im Bereich 0.54 - 0.96 mval/l. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.11. wiedergegeben.

Tabelle 4.11. Einfluß von Lithium auf die cAMP-Bildung im Corpus striatum

Angaben in pmol cAMP/mg Protein × 15 min

	Kontrolle	Lithium
basal	11.6 ± 1.10 (7)	12.2 ± 1.72 (7)
300 µM NA	43.3 ± 3.16 (7)	42.0 ± 4.70 (7)
1 mM DA	21.1 ± 2.82 (7)	19.0 ± 1.58 (7)

Wie auch nach der IMI-Behandlung ergaben sich durch die Lithium-Behandlung im Corpus striatum keine signifikanten Änderungen.

4.2.2. Auswirkungen der Lithium-Behandlung auf die cAMP-Bildung im Hippocampus

Entsprechend den Schnitten vom Corpus striatum wurden Schnitte des Hippocampus untersucht. Es wurde die cAMP-Bildung allerdings nur mit 100 µM NA stimuliert. Wie die Ergebnisse in Tabelle 4.12. zeigen, ergeben sich im Gegensatz zur IMI-Behandlung nach einer Lithium-Behandlung keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 4.12. Einfluß von Lithium auf die cAMP-Bildung im Hippocampus

Angaben in pmol cAMP/mg Protein × 10 min

	Kontrolle	Lithium
basal	8.2 ± 1.50 (5)	8.1 ± 0.55 (6)
100 µM NA	47.4 ± 4.07 (5)	40.7 ± 5.78 (6)

4.2.3. Auswirkungen der Lithium-Behandlung auf die cAMP-Bildung im Cerebellum

Mit elektrophysiologischen Methoden konnte im Cerebellum nach einer Lithium-Behandlung eine erhöhte Empfindlichkeit von Purkinje-Zellen gegen NA gezeigt werden (88). Die Frage war, ob sich diese Supersensitivität im biochemischen Experiment durch Messung der cAMP-Bildung bestätigen läßt.

Die biochemischen Daten im Cerebellum sind, was die AC-Aktivität betrifft, sehr wenig aussagekräftig. Die Lithium-Behandlung ergibt keine signifikanten Änderungen der cAMP-Werte, wohl aber eine Tendenz zur Supersensitivität, wie Tabelle 4.13. zeigt.

Tabelle 4.13. Auswirkungen der Lithium-Behandlung auf die cAMP-Werte im Cerebellum

Angaben in pmol cAMP/mg Protein × 10 min

	Kontrolle	Lithium
basal	95 ± 18.5 (9)	104 ± 14.1 (11)
100 µM NA	197 ± 24.7 (9)	296 ± 38.5 (11)

Hemmt man die Adenosinwirkung, die im Cerebellum sehr stark ist, mit 1 mM Theophyllin, so ändert sich das Bild grundlegend. Die Werte liegen deutlich niedriger und sind jetzt in einer Größenordnung, die der in der Cortex cerebri vergleichbar ist. Die Tendenz zur Supersensitivität nach der Lithium-Behandlung ist aber nicht mehr meßbar. Im Gegenteil, es zeigte sich jetzt eine Tendenz zur Subsensitivität gegen NA, wie aus Tabelle 4.14. hervorgeht.

Tabelle 4.14. Auswirkungen der Lithium-Behandlung auf die cAMP-Werte im Cerebellum in Gegenwart von 1 mM Theophyllin

Angaben in pmol cAMP/mg Protein × 10 min

	Kontrolle	Lithium
basal	8.6 ± 0.90 (7)	8.0 ± 1.00 (7)
100 µM NA	62.8 ± 5.39 (7)	46.0 ± 6.79 (7)

Es ist festzustellen, daß, wider Erwarten, im Cerebellum weder eine Sub- noch eine Supersensitivität des noradrenergen cAMP-Systems - nach IMI- oder Lithium-Behandlung - nachgewiesen werden kann. Dieser Befund korreliert allerdings nicht mit den Ergebnissen elektrophysiologischer Untersuchungen. Dies war der Anlaß zur Suche nach neuen methodischen Ansätzen (vgl. 4.7.).

4.3. Untersuchungen an zellfreien partikulären AC-Präparationen aus verschiedenen Gehirnregionen der Ratte

Eine zellfreie AC-Präparation bietet gegenüber den Untersuchungen mit Gewebeschnitten zwei Hauptvorteile. Es wird erstens für eine Inkubation eine wesentlich kleinere Proteinmenge benötigt (120 µg gegenüber 4 mg), was einerseits sehr kleine Gehirnareale einer Untersuchung zugänglich macht, andererseits die Möglichkeit zu Mehrfachinkubationen bietet, was die Genauigkeit erhöhen sollte. Der zweite Vorteil besteht darin, daß bei Untersuchungen mit einer zellfreien Präparation relativ sichere Aussagen möglich sind, ob es sich bei eventuellen Änderungen um solche auf enzymatischer Ebene oder um Änderungen auf der Rezeptorebene handelt.

4.3.1. Einfluß verschiedener Puffer auf die AC aus Cortex cerebri

Zur Optimierung der Inkubationsbedingungen wurde überprüft, welchen Einfluß verschiedene Puffer bzw. die An- oder Abwesenheit von Ca^{++}-Ionen auf die Aktivität der AC haben. In einer ersten Versuchsreihe wurde der Einfluß des Inkubationspuffers auf die AC-Aktivität geprüft (Homogenisations- und Präparationsverfahren waren gemäß 3.11.). In einer zweiten Versuchsreihe wurde der zur Inkubation verwendete Puffer jeweils auch zur Präparation der AC eingesetzt. Folgende Puffer kamen zum Einsatz:

1) 50 mM Tris-HCl, 14 mM $MgCl_2$, 154 µM $CaCl_2$, 140 µM EGTA, 1,4 mM IBMX, 154 mM NaCl (ca. 290 mOsM)

2) 50 mM Tris-HCl, 14 mM $MgCl_2$, 154 µM $CaCl_2$, 140 µM EGTA, 1,4 mM IBMX (ca. 70 mOsM)

3) 14 mM Tris-HCl, 14 mM $MgCl_2$, 154 µM $CaCl_2$, 140 µM EGTA, 1,4 mM IBMX (ca. 40 mOsM)

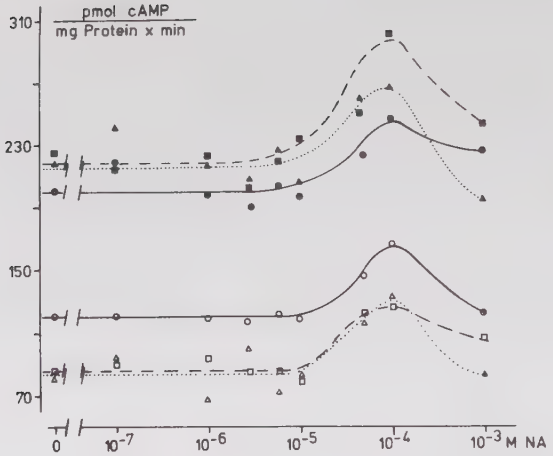
1a) wie 1) jedoch ohne $CaCl_2$

2a) wie 2) jedoch ohne $CaCl_2$

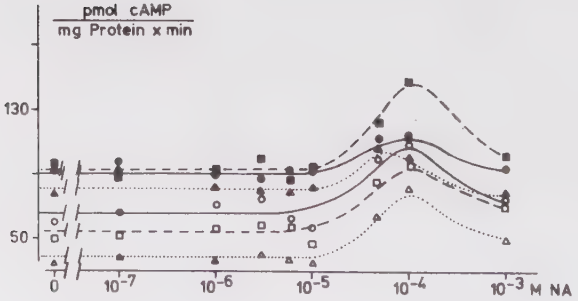
3a) wie 3) jedoch ohne $CaCl_2$

Der pH-Wert aller Puffer war auf 7.4 eingestellt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.3. dargestellt.

Das Fehlen von Ca^{++}-Ionen hat eine verminderte AC-Aktivität zur Folge. Eine Veränderung der Osmolarität ist hingegen ohne großen Einfluß auf die Aktivität der AC, unabhängig davon, ob der jeweilige Puffer nur bei der Inkubation oder auch schon bei der Präparation der AC verwendet wurde. Es wurde deshalb die Methode, wie sie unter 3.11. beschrieben ist, beibehalten.



Nur Inkubationspuffer variiert



Homogenisationspuffer und Inkubationspuffer variiert

Abbildung 4.3. Einfluß verschiedener Puffer auf die AC-Aktivität

4.3.2. Einfluß von IMI auf eine zellfreie AC aus Cortex cerebri

Nachdem die optimalen Inkubationsbedingungen gefunden waren, galt es als erstes zu klären, ob eine zellfreie AC aus Cortex cerebri eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber der Stimulation mit NA zeigt, wenn die Tiere gemäß 3.4.1. mit IMI behandelt wurden.

Hierzu wurde AC von Kontroll- und IMI-Tieren mit 100 nM - 300 µM NA stimuliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.15. und in Abbildung 4.4. dargestellt.

Tabelle 4.15. Einfluß der IMI-Behandlung auf eine zellfreie AC aus Cortex cerebri

Angaben in pmol cAMP/mg Protein × min

	Kontrolle	IMI	2 p <
basal	165 ± 2.3 (15)	160 ± 4.0 (13)	n.s.
100 nM NA	167 ± 3.9 (5)	162 ± 4.3 (4)	n.s.
1 µM NA	175 ± 7.1 (5)	165 ± 8.4 (4)	n.s.
3 µM NA	183 ± 3.5 (14)	170 ± 2.7 (12)	0.01
6 µM NA	193 ± 4.5 (5)	170 ± 5.9 (4)	0.02
10 µM NA	196 ± 5.3 (15)	173 ± 4.9 (12)	0.005
30 µM NA	213 ± 5.1 (15)	186 ± 4.0 (12)	0.001
100 µM NA	224 ± 4.9 (15)	203 ± 4.3 (13)	0.005
300 µM NA	229 ± 4.4 (5)	206 ± 6.0 (4)	0.02

Die unterschiedliche Anzahl von Experimenten ist darauf zurückzuführen, daß nicht bei allen Tieren alle NA-Konzentrationen getestet wurden.

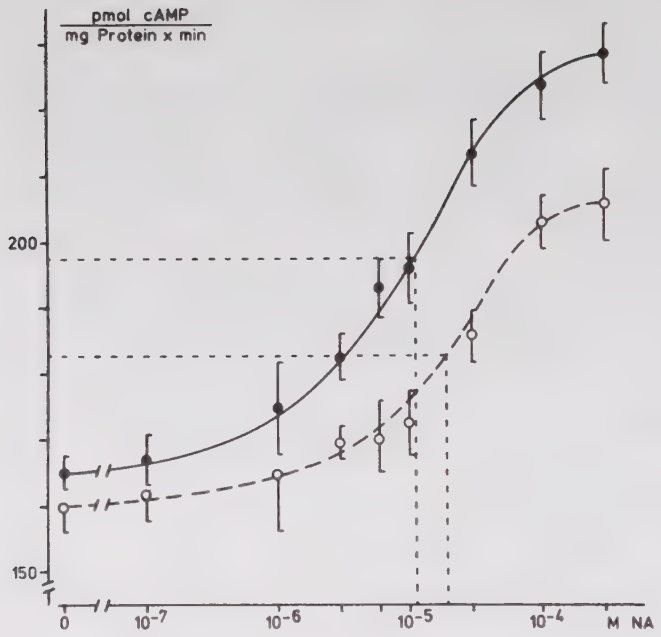


Abbildung 4.4. NA-Dosis-Wirkungs-Kurve mit AC von Kontroll- und IMI-Tieren

Auffallend sind die hohen basalen Werte von ca. 160 pmol cAMP/mg Protein × min, was unter anderem auf die Hemmung der PDE im Inkubationsansatz durch 1 mM IBMX und auf eine Anreicherung der AC durch die Präparationstechnik, die eine Erhöhung der spezifischen AC-Aktivität im Vergleich zum Rohhomogenat bewirkt, zurückzuführen ist.

Die Stimulation mit NA ergibt eine S-förmige Dosis-Wirkungs-Kurve. Die stimulierten Werte sind ab einer NA-Konzentration von 3 µM (Kontroll-Tiere) bzw. 30 µM (IMI-Tiere) signifikant höher als die Basalwerte. Die

maximale Stimulation wird in beiden Gruppen mit 300 µM NA erreicht und beträgt ca. 40% (Kontroll-Tiere) bzw. ca. 25% (IMI-Tiere) über dem Basalwert. Die NA-Konzentration, die eine halbmaximale Stimulation bewirkt, ist bei beiden Gruppen mit 1.1×10^{-5} M bzw. 1.9×10^{-5} M in der gleichen Größenordnung. Die maximale Stimulierbarkeit ist aber bei IMI-Tieren um ca. 30% signifikant verringert. Diese noradrenerge Subsensitivität der AC IMI-behandelter Tiere ist ab einer NA-Konzentration von 3 µM signifikant nachweisbar.

4.3.3. Einfluß von 1 h Inkubation als Gewebeschnitte auf die zellfreie AC aus Cortex cerebri

Da bei der insgesamt einstündigen Vorinkubation der Gewebeschnitte in Krebs-Ringer-Puffer bei der Gehirnschnitt-Methode (vgl. 3.7.) IMI oder seine Metaboliten ausgewaschen werden (80) und auch andere Veränderungen an der Membran auftreten können (hydrolytische Enzyme), wurde untersucht, ob diese Vorinkubation einen Einfluß auf die Aktivität der AC hat und ob dieser Einfluß sich bei Kontroll- und IMI-Tieren unterschiedlich bemerkbar macht.

Hierzu wurde von jedem untersuchten Tier die eine Hälfte der Cortex cerebri geschnitten und insgesamt 1 h inkubiert - wie in 3.7. beschrieben - ; dann wurden die Schnitte homogenisiert und aus ihnen - gemäß 3.11. - eine partikuläre AC hergestellt. Die andere Cortexhälfte wurde unmittelbar zur partikulären AC verarbeitet. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.16. und in Abbildung 4.5. dargestellt.

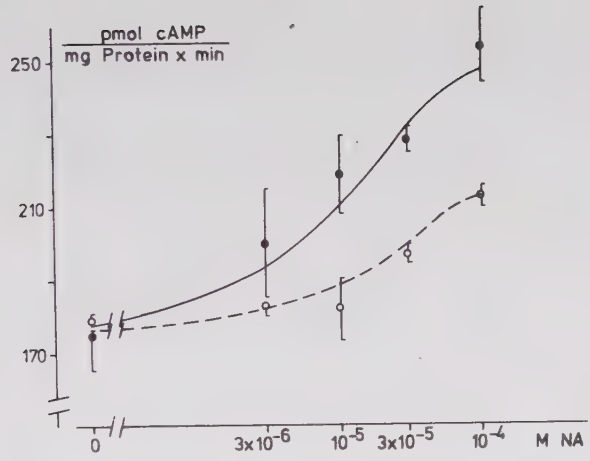
Tabelle 4.16. Einfluß von 1 h Vorinkubation auf die AC-Aktivität

Angaben in pmol cAMP/mg Protein × min

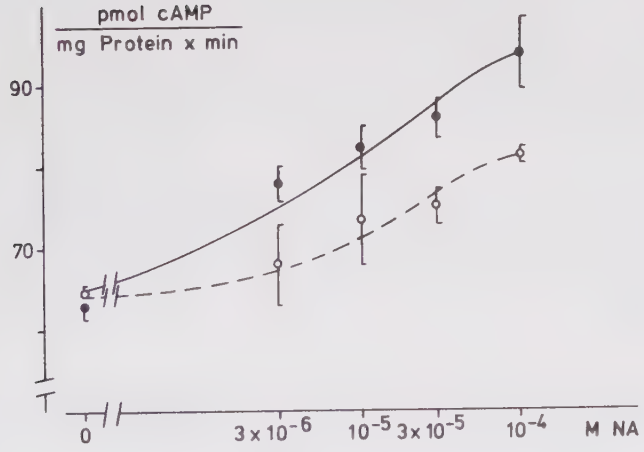
a) ohne Vorinkubation

	Kontrolle (4)	IMI (4)	2 p <
basal	175 ± 9.3	179 ± 0.9	n.s.
3 µM NA	201 ± 14.9	183 ± 2.1	n.s.
10 µM NA	220 ± 10.6	183 ± 8.9	0.05
30 µM NA	229 ± 2.8	197 ± 2.2	0.01
100 µM NA	255 ± 10.2	213 ± 3.1	0.001
b) mit Vorinkubation			
basal	63 ± 1.6	65 ± 0.6	n.s.
3 µM NA	78 ± 2.2	68 ± 5.0	n.s.
10 µM NA	82 ± 2.8	73 ± 5.9	n.s.
30 µM NA	86 ± 2.5	75 ± 2.2	0.02
100 µM NA	94 ± 4.7	82 ± 0.9	0.01

Bemerkenswert ist an diesen Ergebnissen vor allem, daß durch die Vorinkubation als Gehirnschnitte die Aktivität der AC auf ungefähr 1/3 der Ausgangsaktivität zurückgeht. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits von Schultz et al. (83) in Gehirnschnitten beschrieben. Die Stimulierbarkeit mit NA bleibt jedoch erhalten (maximal ca. 40% bei Kontroll-Tieren bzw. ca. 25% bei IMI-Tieren). Die einstündige Vorinkubation ist somit für die grundsätzliche Aussage des Experiments nicht wesentlich.



ohne Vorinkubation



mit Vorinkubation

Abbildung 4.5. Einfluß von 1 h Inkubation auf die AC-Aktivität

4.3.4. Einfluß von DMI in vitro auf die AC-Aktivität

Nachdem Schocker (80) gezeigt hatte, daß zum Zeitpunkt der Tötung der Tiere, d.h. 24 h nach der letzten IMI-Gabe, in der Cortex cerebri IMI fast nicht mehr nachweisbar ist, dafür aber DMI in einer Konzentration von ca. 10 µM, war es von Bedeutung zu wissen, ob DMI in dieser Konzentration in vitro die AC hemmt.

Während der einstündigen Vorinkubation der Gehirnschnitte (vgl. 3.7.) wird ungefähr die Hälfte des DMI ausgewaschen. Es ist zu erwarten, daß durch die Homogenisations- und Zentrifugationsschritte bei der AC-Präparation auch ein Teil des DMI ausgewaschen wird.

Es wurde deshalb die Wirkung von 2 µM und 10 µM DMI auf die AC der Cortex cerebri untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.17. dargestellt.

Tabelle 4.17. Einfluß von DMI in vitro auf die zellfreie AC

Angaben in pmol cAMP/mg Protein × min

	basal (3)	100 µM NA (3)
ohne DMI	218 ± 6.7	301 ± 14.6
2 µM DMI	239 ± 7.1	287 ± 15.4
10 µM DMI	208 ± 7.4	294 ± 14.9

Es sind keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Die statistische Auswertung wurde in diesem Fall mit dem gepaarten Student's t-Test gemacht.

Außerdem wurde eine NA-Dosis-Wirkungs-Kurve mit und ohne 10 µM DMI aufgenommen, die in Abbildung 4.6. wiedergegeben ist.

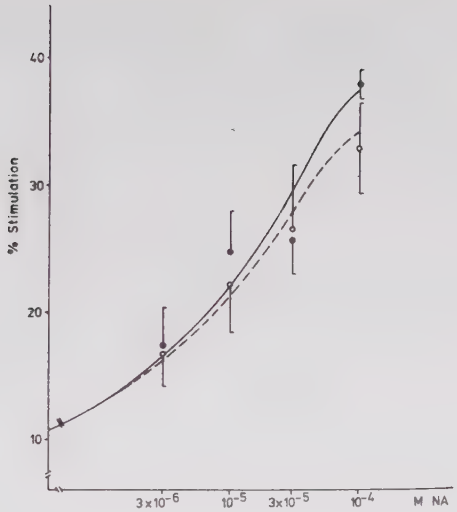


Abbildung 4.6. Einfluß von 10 µM DMI in vitro auf die NA-Stimulation der AC

Auch hier zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der prozentualen Stimulierbarkeit der AC durch NA.

Es handelt sich somit bei der Subsensitivität der AC nach einer IMI-Behandlung nicht um eine unmittelbare Arzneimittelwirkung, sondern wahrscheinlich um einen adaptiven Prozeß.

4.3.5. Stimulation der AC mit GMP-PNP und F^--Ionen

NaF und GMP-PNP stimulieren die AC unter Umgehung ihrer NA-Rezeptoren (52). Vergleicht man die Stimulation mit NaF bzw. GMP-PNP mit der NA-Stimulation bei Kontroll- und IMI-Tieren, so läßt sich entscheiden, ob durch die

Behandlung mit IMI eine Veränderung an der katalytischen Einheit der AC eingetreten ist (Konformationsänderung?) oder ob die IMI-Behandlung die regulatorische Einheit des Enzym-Rezeptor-Komplexes beeinflußt hat.

Das Ergebnis der Untersuchungen ist in Tabelle 4.18. wiedergegeben.

Tabelle 4.18. Einfluß von IMI auf die Stimulation der AC mit GMP-PNP und NaF

Angaben in %-Stimulation über dem Basalwert

	Kontrolle (3)	IMI (3)
100 µM NA	13 ± 1.2*	4 ± 0.5*
100 µM GMP-PNP	446 ± 28.1	483 ± 16.4
5 mM NaF	537 ± 38.2	569 ± 44.8

* = 2 $p < 0.005$

Die Stimulation durch 100 µM NA war bei diesem Experiment geringer als üblicherweise, ist aber dennoch statistisch signifikant. Die AC mit IMI behandelter Tiere ist signifikant subsensitiv gegen NA. In Bezug auf die Stimulation mit GMP-PNP und NaF sind keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren feststellbar.

Eine Veränderung der enzymatischen Aktivität der AC durch die IMI-Behandlung kann somit ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis deutet eher darauf hin, daß die Subsensitivität der AC nach IMI-Gabe auf einer Veränderung des noradrenergen Rezeptorsystems beruht.

4.3.6. Einfluß von IMI auf die zellfreie AC aus Cerebellum, Hippocampus und Corpus striatum

Wie schon mit der Schnittmethode sollte auch mit der zellfreien AC-Präparation die Auswirkung einer neuntägigen IMI-Behandlung auf verschiedene Gehirnteile geprüft werden.

Trotz Austestung unterschiedlicher Puffer und Inkubationsbedingungen sowie verschiedener Präparationsverfahren konnte weder im Cerebellum noch im Hippocampus eine noradrenalinsensitive zellfreie AC gefunden werden. Im Cerebellum sind bereits die Basalwerte sehr hoch (ca. 450 pmol cAMP/mg Protein × min). Diese hohen Basalwerte sind umso bemerkenswerter, als eine Adenosinwirkung wie bei Cerebellumschnitten in Anwesenheit von 1 mM IBMX nicht zu erwarten ist. Daß im Hippocampus keine NA abhängige AC gefunden werden konnte, ist in Anbetracht der Resultate mit der Schnittmethode erstaunlich und kann nur schwer erklärt werden.

Im Corpus striatum wurde nach einer kleinen Modifikation der Präparations- und Inkubationsbedingungen (statt Tris-HCl-Puffer pH 7.4 wurde eine Tris-maleat-Puffer pH 7.7 gleicher Ionenstärke verwendet) eine AC gefunden, die mit NA und DA stimulierbar war. Die Basalaktivität liegt deutlich niedriger als in der Cortex cerebri (ca. 80 pmol cAMP/mg Protein × min). Die Stimulierbarkeit mit DA bzw. NA beträgt ca. 90% und ist somit wesentlich größer als in der Cortex cerebri.

Die Ergebnisse sind im einzelnen in den Tabellen 4.19. und 4.20. und in den Abbildungen 4.7. und 4.8. dargestellt.

Tabelle 4.19. Einfluß von IMI auf die NA sensitive AC aus dem Corpus striatum

Angaben in pmol cAMP/mg Protein × min

	Kontrolle (3)	IMI (3)
basal	81 ± 4.9	84 ± 4.2
3 µM NA	96 ± 5.5	99 ± 4.1
10 µM NA	105 ± 5.1	104 ± 5.0
30 µM NA	124 ± 7.0	129 ± 8.2
100 µM NA	134 ± 6.9	134 ± 5.9
300 µM NA	150 ± 7.5	152 ± 7.3

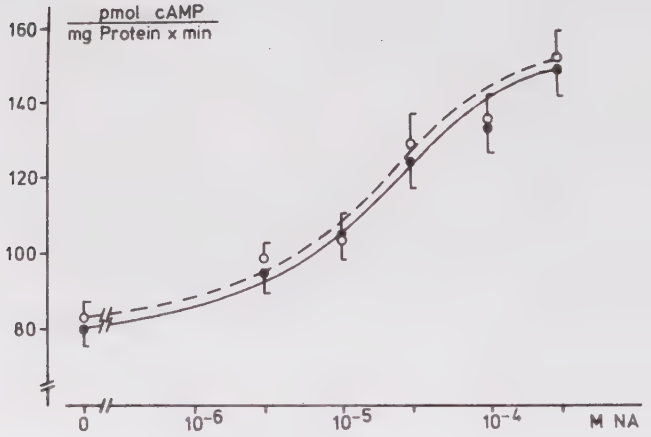


Abbildung 4.7. NA-Dosis-Wirkungs-Kurve mit AC aus dem Corpus striatum von Kontroll- und IMI-Tieren

Tabelle 4.20. Einfluß von IMI auf die DA sensitive AC aus dem Corpus striatum

Angaben in pmol cAMP/mg Protein × min

	Kontrolle (4)	IMI (4)
basal	83 ± 2.8	78 ± 2.7
1 µM DA	92 ± 3.8	88 ± 2.9
3 µM DA	101 ± 6.2	101 ± 5.6
10 µM DA	119 ± 7.0	124 ± 6.2
30 µM DA	136 ± 10.6	141 ± 6.8
100 µM DA	150 ± 9.6	152 ± 4.7

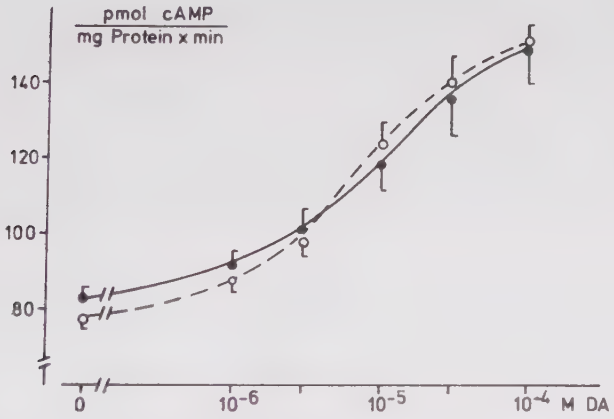


Abbildung 4.8. DA-Dosis-Wirkungs-Kurve mit AC aus dem Corpus striatum von Kontroll- und IMI-Tieren

Es bestehen keine Unterschiede zwischen der AC von IMI- und Kontroll-Tieren hinsichtlich der Stimulation mit NA bzw. DA.

4.4. Messung der PDE-Aktivität nach einer IMI-Behandlung

Unter den Inkubationsbedingungen der zellfreien AC ist keine PDE-Aktivität meßbar. Dies ist dadurch zu erklären, daß die lösliche PDE durch zwei Zentrifugationsschritte abgetrennt wird und der Rest membranständige PDE durch 1 mM IBMX im Inkubationsmedium vollständig gehemmt wird, wie experimentell überprüft wurde. Trotzdem war es wichtig, zu klären, ob die Vorbehandlung der Tiere mit IMI einen Einfluß auf die PDE-Aktivität hat. Es wurde deshalb mit dem PDE-Test nach Pöch (70) die Aktivität der PDE von Kontroll- und IMI-Tieren bestimmt.

Ratten wurden nach 9 Tagen IMI-Behandlung getötet und die PDE in einer Membranpräparation, die der zellfreien AC entsprach, getestet. In den selben Ratten wurde auch die Aktivität der im Cytoplasma gelösten PDE gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.21. wiedergegeben.

Tabelle 4.21. Einfluß von IMI auf die PDE

Angaben in nmol cAMP/mg Protein × min

	Kontrolle (4)	IMI (4)
membranständige PDE	1.9 ± 0.23	1.6 ± 0.13
lösliche PDE	11.3 ± 0.88	10.6 ± 0.89

Es bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der PDE-Aktivität von Präparationen behandelter und unbehandelter Tiere.

4.5. Einfluß einer IMI- bzw. Lithium-Behandlung auf die DHA-Bindung in verschiedenen Gehirnteilen

Um zu klären, ob die noradrenerge Subsensitivität der AC auf einer Veränderung der Eigenschaften oder der Dichte der noradrenergen Rezeptoren beruht, wurden in verschiedenen Gehirnregionen Rezeptor-Bindungsstudien mit radioaktivem DHA, einem ß-Antagonisten, durchgeführt. Vor allem wurde auch der Einfluß einer Lithium-Behandlung auf die Rezeptoren untersucht. Bewußt wurde abweichend von anderen Autoren (17) eine Membranpräparation eingesetzt, die im wesentlichen der partikulären AC entsprach, um so eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Studien zu erreichen.

4.5.1. Einfluß der IMI-Behandlung auf die DHA-Bindung in der Cortex cerebri

Ratten wurden, wie in 3.4.1. beschrieben, mit IMI behandelt und die Bindung von DHA an eine Membranpräparation der Cortex cerebri gemessen. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.22. und in Abbildung 4.9. dargestellt.

Tabelle 4.22. Einfluß von IMI auf die DHA-Bindung in der Cortex cerebri

Angaben in fmol spez. gebunden/mg Protein

DHA frei	Kontrolle	IMI	2 p <
0.7 nM	26 ± 1.9 (12)	18 ± 1.6 (12)	0.005
1.0 nM	52 ± 3.7 (12)	45 ± 2.5 (12)	n.s.
1.4 nM	70 ± 4.8 (12)	64 ± 3.9 (12)	n.s.
2.0 nM	99 ± 2.9 (12)	74 ± 2.4 (11)	0.001
3.0 nM	122 ± 2.3 (11)	104 ± 4.4 (12)	0.005

Tabelle 4.22. Fortsetzung

DHA frei	Kontrolle	IMI	2 p <
4.0 nM	161 ± 11.0 (12)	134 ± 5.5 (12)	0.05
6.0 nM	183 ± 8.8 (12)	180 ± 4.7 (12)	n.s.
8.0 nM	218 ± 8.1 (10)	190 ± 8.5 (10)	0.05
10.0 nM	239 ± 9.0 (8)	207 ± 8.§ (8)	0.05

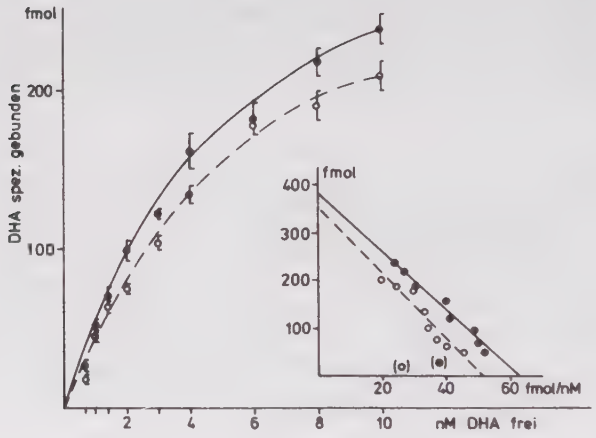


Abbildung 4.9. Einfluß der IMI-Behandlung auf die DHA-Bindung in der Cortex cerebri

Die IMI-Behandlung der Tiere ergibt eine Verminderung der DHA-Bindung, die jedoch nicht bei allen gemessenen DHA-Konzentrationen statistisch signifikant ist. Eine Auftragung nach Scatchard (78), bei der die Menge gebundener Ligand gegen das Verhältnis gebundener/freier Ligand aufgetragen wird, deutet eher auf eine Verminderung der Rezeptorendichte als auf eine Veränderung der Affinität zum Liganden hin.

4.5.2. Einfluß von DMI in vitro auf die DHA-Bindung in der Cortex cerebri

Bei diesem Versuch wurde der Einfluß einer gleichbleibenden DHA-Konzentration von 10 µM in vitro auf die DHA-Bindung untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.23. und in Abbildung 4.10. wiedergegeben.

Tabelle 4.23. Einfluß von 10 µM DMI in vitro auf die DHA-Bindung in der Cortex cerebri

Angaben in fmol spez. gebunden/mg Protein

DHA frei	ohne DMI (4)	mit DMI (4)	2 p <
0.7 nM	24 ± 1.9	16 ± 1.5	0.02
1.0 nM	53 ± 3.1	39 ± 2.5	0.02
1.4 nM	72 ± 4.2	53 ± 2.1	0.01
2.0 nM	107 ± 5.1	71 ± 3.7	0.005
3.0 nM	130 ± 7.1	98 ± 5.7	0.02
4.0 nM	152 ± 4.1	123 ± 4.5	0.005
6.0 nM	197 ± 11.5	165 ± 5.3	0.05
10.0 nM	232 ± 7.4	202 ± 7.9	0.05

Interessant ist, daß im Gegensatz zur IMI-Behandlung der Zusatz von DMI in vitro eine bei allen gemessenen DHA-Konzentrationen signifikante Reduktion der Bindung hervorruft. Trägt man diese Daten nach Scatchard (78) auf, so erhält man bei den Werten mit DMI eine deutlich steilere Gerade als bei den Werten ohne DMI. Dies entspricht einem größeren K_D-Wert und deutet auf eine kompetitive Hemmung der DHA-Bindung durch DMI hin.

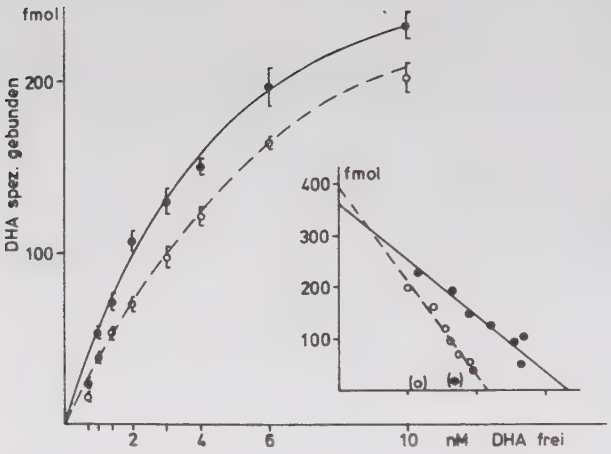


Abbildung 4.10. Einfluß von 10 µM DMI in vitro auf die DHA-Bindung in der Cortex cerebri

4.5.3. Einfluß der IMI-Behandlung auf die DHA-Bindung im Cerebellum

Wie in der Cortex cerebri wurde auch im Cerebellum die DHA-Bindung nach einer IMI-Behandlung - wie in 3.4.1. beschrieben - gemessen. Die Untersuchungen im Cerebellum waren insofern von besonderem Interesse, als in diesem Gehirnteil die Ergebnisse elektrophysiologischer Untersuchungen (88) nicht mit den biochemischen Daten (80) korrelieren.

Das Ergebnis der Untersuchungen ist in Tabelle 4.24. und in Abbildung 4.11. dargestellt.

Tabelle 4.24. Einfluß der IMI-Behandlung auf die DHA-Bindung im Cerebellum

Angaben in fmol spez. gebunden/mg Protein

DHA frei	Kontrolle (6)	IMI (6)	2 p <
0.7 nM	36 ± 2.9	22 ± 3.5	0.02
1.0 nM	47 ± 3.0	36 ± 2.6	0.02
1.4 nM	62 ± 6.1	40 ± 3.7	0.02
2.0 nM	83 ± 7.0	60 ± 3.6	0.02
3.0 nM	111 ± 10.0	74 ± 3.5	0.01
4.0 nM	144 ± 15.2	86 ± 8.2	0.01
6.0 nM	179 ± 11.1	139 ± 8.8	0.02
8.0 nM	180 ± 10.9	142 ± 12.1	0.05
10.0 nM	223 ± 21.0	142 ± 12.3	0.01

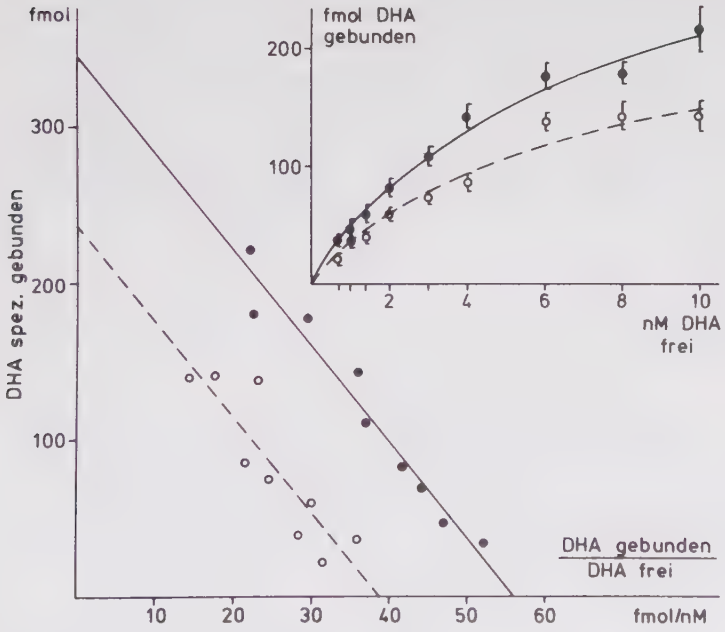


Abbildung 4.11. Einfluß der IMI-Behandlung auf die DHA-Bindung im Cerebellum

Die aus der Scatchard-Darstellung errechneten Werte für B_{max} - als Maß für die Rezeptorendichte - und K_D - als Maß für die Rezeptoraffinität - sind in Tabelle 4.25. wiedergegeben.

Tabelle 4.25. Berechnete Werte für B_{max} und K_D

	Kontrolle	IMI	
K_D	6.16	6.17	nM
B_{max}	346.0	282.1	fmol/mg Protein
r	- 0.9719	- 0.8812	

Es ist eine erstaunliche Übereinstimmung in den K_D-Werten der beiden Gruppen festzustellen. Der B_{max}-Wert der IMI-Tiere ist hingegen ca. 20% niedriger als bei Kontroll-Tieren. Da bei allen gemessenen DHA-Konzentrationen die Werte der IMI-Tiere statistisch signifikant niedriger liegen als bei Kontroll-Tieren, kann daraus geschlossen werden, daß die Dichte der β-adrenergen Rezeptoren im Cerebellum durch die IMI-Behandlung erniedrigt wurde.

4.5.4. Einfluß der Lithium-Behandlung auf die DHA-Bindung im Cerebellum

Ratten wurden - wie in 3.4.1. beschrieben - mit LiCl behandelt und die DHA-Bindung gemessen. Dieser Versuch wurde parallel zu dem in 4.5.3. geschilderten durchgeführt, sodaß die Kontroll-Tiere für beide Versuche dieselben waren.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.26. und in Abbildung 4.12. wiedergegeben. Die aus der Scatchard-Darstellung errechneten Werte sind in Tabelle 4.27. zusammengefaßt.

Tabelle 4.26. Einfluß der Lithium-Behandlung auf die DHA-Bindung im Cerebellum

Angaben in fmol spez. gebunden/mg Protein

DHA frei	Kontrolle (6)	Lithium (6)
0.7 nM	36 ± 2.9	38 ± 4.0
1.0 nM	47 ± 3.0	48 ± 3.1
1.4 nM	62 ± 6.1	53 ± 6.1
2.0 nM	83 ± 7.0	82 ± 5.1
3.0 nM	111 ± 10.0	111 ± 9.2
4.0 nM	144 ± 15.2	118 ± 12.9
6.0 nM	179 ± 11.1	197 ± 17.1
8.0 nM	180 ± 10.9	204 ± 18.0
10.0 nM	223 ± 21.0	229 ± 20.9

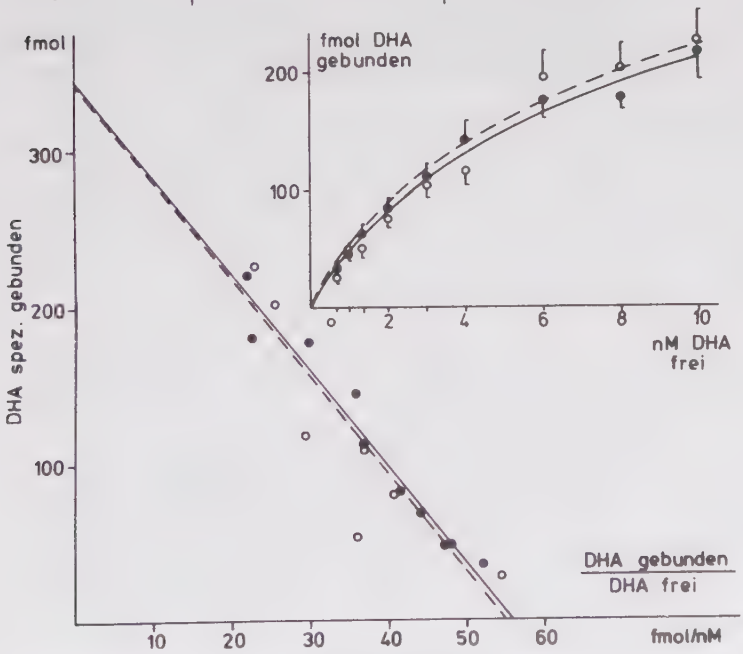


Abbildung 4.12. Einfluß der Lithium-Behandlung auf die DHA-Bindung im Cerebellum

Tabelle 4.27. Berechnete Werte für B_{max} und K_D

	Kontrolle	Lithium	
K_D	6.16	6.14	nM
B_{max}	346.0	344.7	fmol/mg Protein
r	- 0.9719	- 0.8678	

Die Lithium-Behandlung ergibt keine statistisch signifikante Veränderung der DHA-Bindung. Die Meßwerte bei den einzelnen DHA-Konzentrationen sind zwar unterschiedlich, die Regressionsgeraden in der Scatchard-Darstellung decken sich aber weitgehend.

4.6. Einfluß der IMI-Behandlung auf die 5-HT-Bindung in verschiedenen Gehirnteilen

Entsprechend einer Hypothese von Carlsson et al. (18) soll bei der Depression neben dem noradrenergen Neurotransmittersystem auch das serotoninerge eine bedeutende Rolle spielen. Carlsson macht eine Störung der Katecholamine für die Antriebsschwäche und eine Störung des Serotonins für die Stimmungslage verantwortlich.

Da im Gegensatz zu juvenilen Ratten, bei denen eine serotoninerge AC nachgewiesen ist, bei erwachsenen Tieren keine direkt meßbare Serotoninwirkung gesichert ist, können Veränderungen am zentralen serotoninergen System nur mit Verhaltensmodellen oder Rezeptor-Bindungsstudien nachgewiesen werden. Deshalb wurde in verschiedenen Gehirnteilen, deren Gehalt an 5-HT überdurchschnittlich hoch ist (55), Rezeptor-Bindungsstudien nach einer IMI-Behandlung durchgeführt.

4.6.1. Einfluß der IMI-Behandlung auf die 5-HT-Bindung in der Cortex cerebri

Die Tiere wurden - wie in 3.4.1. beschrieben - mit IMI behandelt und die Bindungsfähigkeit eines Gewebehomogenats gemäß 3.15.1. bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.28. und in Abbildung 4.13. wiedergegeben.

Tabelle 4.28. Einfluß der IMI-Behandlung auf die 5-HT-Bindung in der Cortex cerebri

Angaben in fmol spez. gebunden/mg Protein

5-HT frei	Kontrolle (4)	IMI (4)
0.7 nM	4.5 ± 0.57	4.4 ± 0.16
1.8 nM	9.3 ± 0.65	7.7 ± 0.95
3.0 nM	12.4 ± 1.83	11.3 ± 1.62
4.0 nM	15.6 ± 3.02	13.5 ± 1.19
8.0 nM	22.4 ± 2.97	21.7 ± 2.34
18.0 nM	28.3 ± 2.39	27.9 ± 1.78

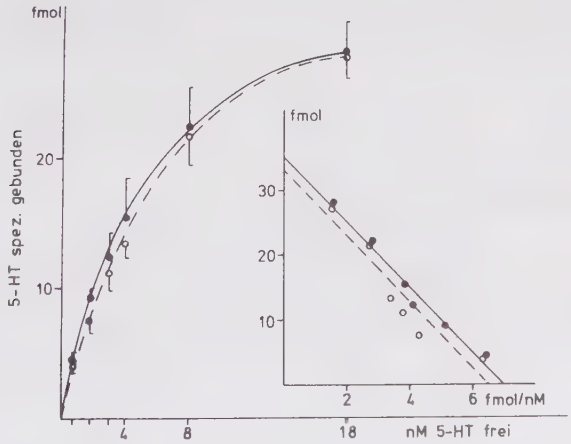


Abbildung 4.13. Einfluß der IMI-Behandlung auf die 5-HT-Bindung in der Cortex cerebri

Die nach der IMI-Behandlung gemessenen Werte liegen zwar immer etwas tiefer als bei den Kontroll-Tieren, erreichten aber bei keiner 5-HT-Konzentration statistisch signifikantes Niveau.

4.6.2. Auswirkungen der IMI-Behandlung auf die 5-HT-Bindung im Corpus striatum und im Hippocampus

Wie bei 4.6.1. beschrieben, wurde auch im Corpus striatum und im Hippocampus die Bindungsfähigkeit für 5-HT bei Kontroll- und IMI-Tieren gemessen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4.29. und 4.30. dargestellt.

Tabelle 4.29. Auswirkungen der IMI-Behandlung auf die 5-HT-Bindung im Corpus striatum

Angaben in fmol spez. gebunden/mg Protein

5-HT frei	Kontrolle (3)	IMI (3)
1.8 nM	12.1 ± 1.91	10.1 ± 2.17
4.0 nM	24.3 ± 3.17	27.2 ± 1.92
8.0 nM	41.9 ± 3.90	42.1 ± 4.11
12.0 nM	54.4 ± 6.03	45.0 ± 9.12
18.0 nM	71.6 ± 5.99	69.1 ± 8.03

Tabelle 4.30. Auswirkungen der IMI-Behandlung auf die 5-HT-Bindung im Hippocampus

Angaben in fmol spez. gebunden/mg Protein

5-HT frei	Kontrolle (3)	IMI (3)
1.8 nM	19.9 ± 1.98	17.1 ± 2.01
4.0 nM	31.2 ± 3.27	30.2 ± 3.57
8.0 nM	44.9 ± 5.02	48.0 ± 4.19
12.0 nM	58.5 ± 6.09	55.0 ± 6.17

Auch in diesen Gehirnteilen konnte mit dem Bindungstest keine Auswirkung der IMI-Behandlung auf die 5-HT-Rezeptoren festgestellt werden. In beiden Gehirnarealen liegt die je Milligramm Protein gebundene 5-HT-Menge bei allen gemessenen Konzentrationen etwa doppelt so hoch wie in der Cortex cerebri, was auf eine größere Dichte serotoninerger Rezeptoren in diesen Gehirnteilen hinweist.

4.6.3. Auswirkungen von DMI in vitro auf die 5-HT-Bindung in der Cortex cerebri

Die Bindungsaktivität von Gewebehomogenat der Cortex cerebri unbehandelter Tiere wurde gemessen und dabei dem Inkubationsansatz bei gleichbleibender 5-HT-Konzentration steigende Mengen von DMI zugesetzt. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.31. und in Abbildung 4.14. wiedergegeben.

Tabelle 4.31. Einfluß von DMI in vitro auf die 5-HT-Bindung

Angaben in fmol spez. gebunden/mg Protein
5-HT-Konzentration: 8.0 nM

ohne DMI	22.0 ± 1.04	(6)
100 nM DMI	20.1 ± 1.08	(6)
1 µM DMI	15.4 ± 1.21	(6)*
3 µM DMI	10.6 ± 1.55	(6)**
10 µM DMI	5.6 ± 0.98	(6)**
100 µM DMI	1.0 ± 0.52	(6)**

* = 2 $p < 0.005$; ** = 2 $p < 0.001$

DMI hemmt die 5-HT-Bindung dosisabhängig.

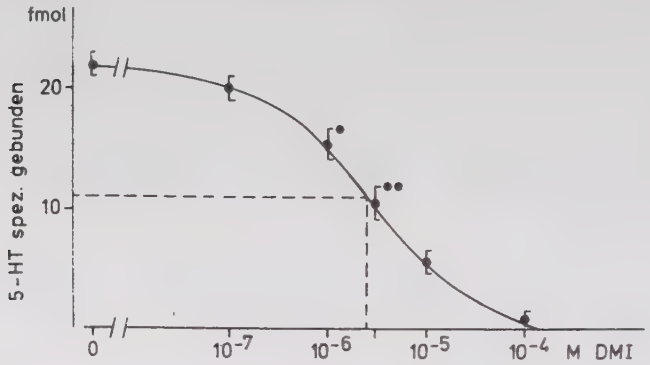


Abbildung 4.14. Einfluß von DMI in vitro auf die 5-HT-Bindung

DMI hemmt die 5-HT-Bindung dosisabhängig. Bei der vorgewählten 5-HT-Konzentration von 8 nM (das ist die Konzentration, bei der die Bindung etwa halb gesättigt ist) wird schon mit 1 µM DMI eine statistisch signifikante Hemmung erreicht. 10 µM DMI - eine Konzentration, die im Gehirn in vivo durchaus auftreten kann (80) - hemmt die Bindung zu ca. 75%.

4.7. Untersuchungen mit röntgenbestrahlten Ratten

Das Cerebellum bzw. die IMI- und Lithium-Wirkungen im Cerebellum bilden einen Schwerpunkt dieser Arbeit, weil - wie schon in 4.2. und 4.5. gezeigt oder erwähnt - die experimentellen Befunde, die in diesem Teil des Gehirns erhalten wurden, nicht richtig zusammenzupassen scheinen. So findet sich keine Subsensitivität des noradrenergen cAMP-Systems nach einer IMI-Behandlung, aber es entwickelt sich eine verminderte Rezeptorendichte um ca. 20%. Ferner fanden Siggins und Schultz (88) eine

verminderte Empfindlichkeit der Purkinje-Zellen gegenüber iontophoretisch appliziertem NA in elektrophysiologischen Experimenten.

Es stellt sich also die Frage, ob nicht auch im Cerebellum eine Subsensitivität postsynaptischer Zellen (Purkinje-Zellen?) gegen NA die Folge einer Langzeitbehandlung mit IMI ist. Diese Subsensitivität könnte vor einem sehr hohen Hintergrund anderer cAMP produzierender Zellen, die auf eine IMI-Behandlung nicht ansprechen, nicht meßbar sein. Die Daten, die nach der Behandlung der Tiere mit Lithium erhalten wurden, könnten diese These der Nichtmeßbarkeit stützen. Es findet sich hierbei in biochemischen Experimenten eine Tendenz zur Supersensitivität des cAMP-Systems gegen NA, die im elektrophysiologischen Experiment manifest ist.

Es wurde deshalb nach einer Möglichkeit gesucht, den hohen Hintergrund zu senken, um eventuelle Änderungen meßbar zu machen. Versuche, mit Theophyllin die Adenosinwirkung zu hemmen, brachten nicht den gewünschten Erfolg (vgl. 4.2.3.). Dies könnte die These weniger subsensitiver Purkinje-Zellen in einem Meer von unveränderten Zellen erhärten.

Man müßte - wenn die These stimmt - in einem Cerebellum, in dem die Purkinje-Zellen angereichert sind, eine Subsensitivität des cAMP-Systems gegen NA nachweisen können.

Bei Mäusen gibt es Mutanten, die keine Körnerzellen im Kleinhirn besitzen. Diese Mutanten scheiden aber als Untersuchungsobjekt aus, da bei ihnen das Fehlen der Körnerzellen auf einen genetischen Defekt der Purkinje-Zellen zurückzuführen ist (21,46,47,86). Vielversprechender erschien ein methodischer Ansatz, der an Arbeiten von der Gruppe um Altman (6,7,10) und von Woodward et al. (103) anschließt. Diese Gruppen bestrahlen neugeborene

Ratten mit Röntgenstrahlen und erhalten so ein Cerebellum, das fast keine Körnerzellen mehr enthält. Um die Methode näher zu erläutern, ist es nötig, genauer auf die Kleinhirnanatomie einzugehen.

4.7.1. Kurzer Abriß der Anatomie der Kleinhirnrinde und deren Entwicklung (nach Palay und Chan-Palay (66))

Die Kleinhirnrinde ist eine vielfach gewundene Schicht aus grauer Substanz, die aus drei morphologisch unterscheidbaren Lagen besteht.

Die äußerste Lage heißt molekulare Schicht. Sie wird aus den Dendritenbäumen der Purkinje-Zellen und den Parallelfasern gebildet. Die Parallelfasern sind die T-förmig ausgebildeten Axone der Körnerzellen, deren Querteile alle parallel zu den Kleinhirnwindungen und senkrecht zu den Dendritenbäumen der Purkinje-Zellen verlaufen. In diese regelmäßige Matrix sind die Sternzellen und die Korbzellen eingelagert, die beide lokale Interneurone darstellen.

Die zweite Schicht, die ganglionäre Schicht, besteht aus einer Lage Purkinje-Zellen. Die Purkinje-Zellen sind die einzigen Neurone, deren Axone die Kleinhirnrinde verlassen. Sie stellen sozusagen die Ausgangsseite des "Computers Cerebellum" dar.

Die dritte, die gekörnte Schicht, ist ein extrem dicht gepacktes Gewebe aus kleinen Neuronen, den Körnerzellen, die sehr zahlreich sind (ca. 10^{11} Zellen beim Menschen). In ihr kommen ferner als aufsteigende Axone die Kletter- und die Moosfasern vor sowie als Interneurone die Golgizellen. Die Kletterfasern bilden mit den Purkinje-Zellen zahlreiche Synapsen, während die Moosfasern mit den Kör-

nerzellen unter synaptischer Verknüpfung die sogenannten Kleinhirninseln (glomeruli cerebelli) bilden. Beides zusammen stellt die Eingangsseite der Kleinhirnrinde dar.

Im Jahr 1969 entdeckten Hökfelt und Fuxe (39) unter dem Fluoreszenzmikroskop eine neue Art von Fasern in der Kleinhirnrinde, die den Neurotransmitter NA enthielten. Diese Fasern steigen durch alle Schichten auf, wobei sie in der Purkinje-Zellschicht angehäuft erscheinen. Olson und Fuxe (64) ermittelten 1971 den Locus coeruleus als den Ursprung dieser Fasern. Die Arbeitsgruppe um Bloom (14,41,87) postulierte, daß diese noradrenergen Fasern mit den Purkinje-Zellen inhibitorische Synapsen bilden, weil die mikroiontophoretische Applikation von NA die Feuerrate der spontan aktiven Purkinje-Zellen unterdrückt. Es liegt daher der Schluß nahe, daß es sich bei diesen noradrenergen Fasern um ein drittes afferentes System der Kleinhirnrinde handelt.

Ratten werden mit einem sehr wenig entwickelten Cerebellum geboren. Bei der Geburt sind die Purkinje-Zellen bereits angelegt (1), während alle anderen Zellen noch fehlen. Die Purkinje-Zellen liegen zu dieser Zeit noch nicht in einer definierten Schicht vor, sondern sind in der Rinde verstreut. Die oberste Schicht des neonatalen Rattencerebellums ist eine germinative Schicht, die große Zellteilungsraten aufweist (1). In ihr werden Korb-, Stern- und Körnerzellen gebildet. Die Körnerzellen wandern unter Ausbildung der Parallelfasern durch die Purkinje-Zellschicht hindurch und bilden die granuläre Schicht. Dieser Prozeß findet etwa in den ersten zwei Lebenswochen statt (2,3).

4.7.2. Auswirkung von Röntgenstrahlen auf das sich entwickelnde Cerebellum von Ratten

Proliferierende Zellen sind wesentlich empfindlicher gegen ionisierende Strahlen als reife oder sich differenzierende Zellen (38). Bestrahlt man neugeborene Ratten am Tag der Geburt mit niedrig dosierten Röntgenstrahlen, so vernichtet man die germinative Schicht fast vollständig; die überlebenden Zellen sind aber in der Lage, sie vollständig zu regenerieren (4,5). Setzt man aber die Bestrahlung mit niedrigerer Dosis über 14 Tage fort, so haben die Zellen in der germinativen Schicht ihre Teilungsfähigkeit verloren. Man erhält so Ratten, deren rudimentäres Cerebellum fast keine Körner-, Korb- und Sternzellen enthält (4). Golgi- und Purkinje-Zellen sowie Moos- und Kletterfasern sind intakt. Es kommt hierbei zu ungewöhnlichen Verschaltungen der Neurone untereinander (71,104). Die Purkinje-Zellen bleiben aber elektrophysiologisch und pharmakologisch weitgehend normal (103). Auch die noradrenergen Fasern vom Locus coeruleus scheinen normal ausgebildet zu sein. Die Purkinje-Zellen besitzen also anscheinend eine gewisse Autonomie, die eine normale Funktion auch in Abwesenheit der normalen Afferenzen gewährleistet. Dies zeigen auch Arbeiten mit mutierten Mäusen (21,87).

In einem solchermaßen bestrahlten Cerebellum sollte es möglich sein, die elektrophysiologisch manifeste Subsensitivität der Purkinje-Zellen gegen NA als eine verminderte Empfindlichkeit des cAMP-Systems nachzuweisen.

4.7.3. Einfluß der IMI-Behandlung auf das cAMP-System des degranulierten Cerebellums

Die mit Röntgenstrahlen vorbehandelten Ratten erhielten gemäß 3.4.1. IMI und wurden nach 3.7. untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen streuten etwas stärker als üblich. Dies rührt von den in Folge des kleinen Cerebellums sehr geringen Proteinmengen her, mit denen experimentiert werden mußte. Dies bedingt natürlicherweise etwas größere relative Fehler bei jedem einzelnen Versuchsschritt. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.32. zusammengefaßt. Um das grundsätzliche Gelingen des Versuchs zu überprüfen, wurden parallel Gehirnschnitte unbehandelter, nicht degranulierter Ratten inkubiert.

Tabelle 4.32. Einfluß der IMI-Behandlung auf das cAMP-System im degranulierten Cerebellum

Angaben in pmol cAMP/mg Protein × 10 min

	basal	100 µM NA
unbehandelte Kontroll-Tiere	24.0 ± 1.43 (4)	169.7 ± 12.96 (4)
degranulierte Kontroll-Tiere	23.3 ± 3.35 (4)	44.4 ± 2.62 (4)*
degranulierte IMI-Tiere	25.4 ± 0.55 (4)	35.7 ± 1.08 (5)*

* = 2 $p < 0.02$

Dieses Resultat ist in zweierlei Hinsicht bemerkenswert. Erstens ist die gegenüber unbehandelten Ratten drastisch verringerte Stimulierbarkeit des cAMP-Gehalts der Schnitte bei unverändertem Basalwert auffällig. Der gleichbleibende Basalwert könnte ein Hinweis darauf sein, daß der Verlust an cAMP erzeugenden Zellen etwa dem Verlust an Zellmasse (≙ Proteinmenge) entspricht. Die geringere Stimulierbarkeit deutet auf eine unterschiedliche Erregbarkeit der verschiedenen Zelltypen hin, die auf unterschiedlichen Rezeptortypen beruhen könnte. Die durch die Röntgenbestrahlung verlorengegangenen Zellen reagieren offensichtlich auf einen NA-Reiz mit einer

viel stärkeren cAMP-Produktion. Dies wurde auch schon von Hoffer et al. (40) gezeigt.

Zweitens ist die signifikante Subsensitivität des cAMP-Systems mit IMI behandelter degranulierter Ratten gegen NA bemerkenswert. Diese Subsensitivität, die bei nicht bestrahlten Tieren nur tendenziell zu erkennen ist, ist bei den degranulierten Tieren manifest. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß ein Angriffspunkt der IMI-Wirkung im Cerebellum die Purkinje-Zellen sind.

4.7.4. Einfluß der Lithium-Behandlung auf das cAMP-System des degranulierten Cerebellums

Dieser Versuch wurde parallel zu dem in 4.7.3. beschriebenen durchgeführt, sodaß das dort bezüglich der Streuung Gesagte auch hier gilt. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.33. wiedergegeben.

Tabelle 4.33. Einfluß der Lithium-Behandlung auf das cAMP-System im degranulierten Cerebellum

Angaben in pmol cAMP/mg Protein × 10 min

	basal	100 µM NA
degranulierte Kontroll-Tiere	23.3 ± 3.35 (4)	44.4 ± 2.62 (4)
degranulierte Lithium-Tiere	26.7 ± 1.38 (5)	43.1 ± 2.27 (5)

Im Gegensatz zur IMI-Behandlung ergibt sich durch die Lithium-Behandlung keine Veränderung der Empfindlichkeit des noradrenergen cAMP-Systems.

4.7.5. Einfluß der Lithium-Behandlung auf die DHA-Bindung im degranulierten Cerebellum

Bei mit Lithium behandelten und unbehandelten Tieren wurde die Bindung von DHA an eine Membranpräparation gemäß 3.16. gemessen. Wegen der nur begrenzt zur Verfügung stehenden Menge bestrahlter Tiere und der kleinen Proteinmenge, die ein degranuliertes Cerebellum ergibt, wurde die je Inkubationsansatz eingesetzte Proteinmenge auf 0.5 mg reduziert. Es war auch nicht möglich, mit genügender statistischer Absicherung mehrere DHA-Konzentrationen zu testen, um die Bindungsaffinität und die Rezeptorendichte zu bestimmen. Es wurde zur Bindung die DHA-Konzentration von 1 nM gewählt. Bei dieser Konzentration ist das Verhältnis von unspezifischer zu spezifischer Bindung noch günstig, und sie liegt auch in einem Bereich, in dem eine hinreichend große Radioaktivitätsmenge gebunden wird, um eine genaue Zählung zu ermöglichen. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.34. dargestellt.

Tabelle 4.34. Einfluß der Lithium-Behandlung auf die DHA-Bindung im degranulierten Cerebellum

Angaben in fmol spez. gebunden/mg Protein

Kontroll-Tiere	21.0 ± 2.69	(6)
Lithium-Tiere	21.9 ± 2.02	(6)

Auch in diesem Versuch ergab sich kein Hinweis darauf, daß eine Lithium-Behandlung das noradrenerge cAMP-System des Kleinhirns beeinflußt.

5. Diskussion

Die Diskussion der Ergebnisse ist in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil werden die nach einer IMI-Behandlung erhaltenen Ergebnisse diskutiert. Anhand der Untersuchungen in der Großhirnrinde wird ein Modell der IMI-Wirkung erstellt und untersucht, ob dieses Modell auf andere Gehirnteile übertragbar ist. Im zweiten Teil werden die Auswirkungen einer Lithium-Behandlung erörtert.

5.1. Imipramin

Die in dieser Arbeit beschriebene Reduktion des noradrenergen cAMP-Systems der Großhirnrinde von Ratten ist eine Folge der IMI-Behandlung, die bereits von mehreren Autoren (31,81,99) beschrieben wurde. Dieser Befund ist auch schon im Zusammenhang mit dem Wirkungsmechanismus der trizyklischen Antidepressiva diskutiert worden. Allerdings wurden hierbei Dosierungen von IMI (bzw. DMI) verwendet, die deutlich über dem therapeutisch Üblichen lagen.

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß IMI schon bei der neuntägigen Gabe von 3 mg/kg/d die Stimulierbarkeit des cAMP bildenden Enzymsystems statistisch signifikant vermindert (4.1.1.). Dieses Ergebnis unterstützt beträchtlich die Annahme, daß die noradrenerge Subsensitivität des cAMP-Systems am Wirkungsmechanismus von IMI zumindest beteiligt ist. Hierfür spricht auch, daß es ca. 9 Tage dauert, bis die Subsensitivität voll entwickelt ist. Dieser Zeitverlauf deckt sich weitgehend mit dem des klinischen Wirkungseintritts. Eben dieser verzögerte Wir-

kungseintritt ist eines der besten Argumente gegen eine unmittelbare antidepressive Wirkung von IMI.

Lange Zeit wurde angenommen, daß eine Erhöhung der NA-Konzentration im synaptischen Spalt - bedingt durch die Hemmung der Rückaufnahme von NA in das präsynaptische Axon - der Wirkungsmechanismus der trizyklischen Antidepressiva sei. Die Untersuchungen von Schocker (80) ergaben, daß zwischen der Hemmung der Rückaufnahme und dem klinischen Wirkungseintritt keine zeitliche Übereinstimmung besteht. 1 h nach einer einmaligen IMI-Gabe ist die Rückaufnahme von NA vollständig gehemmt. Das noradrenerge cAMP-System ist zu diesem Zeitpunkt aber noch normal empfindlich. Da nach 1 h auch noch kein therapeutischer Effekt sichtbar ist, ist ein direkter Zusammenhang zwischen der Hemmung der Rückaufnahme von NA und der antidepressiven Wirkung von IMI unwahrscheinlich. Eher ist es wahrscheinlich, daß IMI im Gehirn adaptive Vorgänge auslöst, die zu einer Besserung des depressiven Zustands führen.

Es sind grundsätzlich zwei Ursachen dafür denkbar, daß bei IMI-behandelten Tieren nach Stimulation mit NA geringere cAMP-Spiegel erreicht werden: eine verminderte Synthese oder ein verstärkter Abbau von cAMP.

Durch die neuntägige IMI-Behandlung wird weder die membrangebundene noch die im Cytosol gelöste PDE beeinflußt (4.4.). Ein verstärkter cAMP-Abbau ist somit wahrscheinlich nicht die Ursache dafür, daß in IMI-behandelten Tieren die stimulierten cAMP-Spiegel niedriger sind als in unbehandelten.

Eine verminderte Synthese von cAMP kann mehrere Ursachen haben. Es könnte(n)

1) die enzymatische Aktivität der AC vermindert sein.
2) die Kopplung Rezeptor - Enzym gestört sein.
3) die noradrenergen Rezeptoren verändert sein.

Diese Möglichkeiten wurden in der vorliegenden Arbeit überprüft.

Um die ersten zwei Möglichkeiten zu prüfen, war es zunächst nötig, eine zellfreie AC herzustellen und nachzuweisen, daß die IMI-bedingte Subsensitivität nicht an intakte zelluläre Strukturen gebunden ist, sondern auch in einem zellfreien System - einer rohen AC-Präparation, die, wie du Moulin (63) zeigte, aus Synaptosomen besteht - meßbar ist.

Die zellfreie AC ist mit NA stimulierbar. Die maximalen cAMP-Werte liegen bei Kontrolltieren ca. 40%, bei IMI-Tieren ca. 25% über den Basalwerten. Das Ausmaß der Subsensitivität ist zwar deutlich geringer als in Gehirnschnitten, aber reproduzierbar und ab einer NA-Konzentration von 3 µM statistisch signifikant (4.3.1.),(96).

Im Gegensatz zu den cAMP-Messungen in Schnitten erfaßt man im zellfreien System keine Gleichgewichtsspiegel von cAMP, die als Resultanten der Aktivitäten von PDE und AC gesehen werden können, sondern die enzymatische Aktivität der AC. Die PDE ist in diesem System weitgehend abgetrennt und die verbliebene Aktivität vollständig gehemmt. Die gemessenen cAMP-Werte in Schnitten bzw. Homogenat sind also nicht miteinander vergleichbar.

GTP stimuliert die AC, indem es an eine regulatorische Untereinheit des Enzyms bindet. Nur wenn GTP gebunden ist, ist die AC aktiv und kann mit Neurotransmittern stimuliert werden. Dieses GTP bindende Protein hat eine GTPase-Aktivität, die durch Katecholamime stimulierbar ist. Die Aktivität der AC wird von der "steady state"-Konzentration ihrer aktiven Form bestimmt. Die Katecholamine stimulieren die AC also nicht nur, sondern sie regeln auch über einen Mechanismus, der einer negativen Rückkopplung vergleichbar ist, die Aktivität der AC.

F^--Ionen stimulieren die AC, indem sie an die GTPase binden. Die Stimulation der AC mit F^--Ionen und GMP-PNP (ein von der GTPase nicht hydrolisierbares GTP-Analog) ist "quasi irreversibel" und damit wesentlich größer als die mit GTP oder Neurotransmittern zu erzielende (19,20, 52).

Die Stimualtion mit GMP-PNP oder F^--Ionen wird durch eine IMI-Behandlung nicht beeinflußt (4.3.5.), ein Hinweis darauf, daß die enzymatische Aktivität der AC und auch die Enzym-Rezeptor-Kopplung über das GTP bindende Protein durch IMI nicht in ihrer Funktionsfähigkeit beeinträchtigt werden.

Für eine geringere Empfindlichkeit der Adrenozeptoren sind folgende überprüfbare Ursachen denkbar:

1) Eine Konkurrenz von IMI (bzw. DMI) mit NA um die Rezeptoren im Sinne einer kompetitiven Hemmung

2) Eine Konformationsänderung der Rezeptoren unter dem Einfluß von IMI (bzw. DMI), die eine Verminderung der Affinität zum Hormon ergibt

3) Eine kovalente Veränderung der Rezeptoren (Phosphorylierung, Methylierung etc.), die eine Bindung des Agonisten verhindert

4) Eine Verminderung der Anzahl der Rezeptoren, sei es durch Abbau von Rezeptoren oder durch Hemmung der Neusynthese von Rezeptoren

Für die erste Möglichkeit spricht, daß DMI die Bindung von DHA an ß-Rezeptoren in der Großhirnrinde hemmt (4.5.2.). Allerdings ist diese Hemmung bei einer DMI-Konzentration von 10 µM, die sicher an der oberen Grenze des therapeutisch zu Erwartenden liegt, eher als gering zu beurteilen. Die gleiche DMI-Konzentration ist auch ohne Einfluß auf die Stimulation der AC mit 100 µM NA (4.3.4.). Gegen die Annahme einer Konkurrenz zwischen

IMI (bzw. DMI) und NA spricht ferner, daß ein solcher Wirkungsmechanismus nicht mit dem verzögerten Eintritt der therapeutischen Wirkung in Einklang zu bringen ist. Dies schließt eine Bindung von IMI oder DMI an adrenerge Rezeptoren selbstverständlich nicht aus, sondern nur einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen der Adrenozeptor-Bindung von IMI und der antidepressiven Wirkung.

Aufschluß darüber, welche der anderen Möglichkeiten zutrifft, können Rezeptor-Bindungsstudien geben. Nach 9 Tagen IMI ist in der Großhirnrinde die Bindungsfähigkeit für DHA deutlich erniedrigt (4.5.1.). Die Auftragung der Daten nach der von Scatchard (78) beschriebenen Methode deutet auf eine Verringerung der Rezeptorendichte hin, kann aber eine Änderung der Rezeptoraffinität nicht vollständig ausschließen. Eindeutiger als die eigenen Daten, deren geringe Aussagekraft auf eine große statistische Streuung zurückzuführen ist, sind Ergebnisse von Banerjee et al. (9), Sarai et al. (77), Wolfe et al. (101) und Bergstrom und Kellar (13), die alle eine signifikante Verminderung der ß-adrenergen Bindungsstellen in der Großhirnrinde zeigen. Dieser Punkt wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt.

Man muß also gegenwärtig davon ausgehen, daß die noradrenerge Subsensitivität der AC nach einer Langzeitbehandlung mit IMI auf eine geringere Anzahl von Adrenozeptoren zurückzuführen ist. Wie die Rezeptorenanzahl verringert wird, ist bis heute ungeklärt. Hierfür sind zweierlei Mechanismen denkbar:

1) Die Rezeptoren werden so verändert, daß sie keine Affinität zu NA mehr haben.

2) Die Rezeptoren werden abgebaut, oder im Rahmen des normalen Proteinstoffwechsels abgebaute Rezeptoren werden nicht durch eine Neusynthese ersetzt.

Während die erste Möglichkeit eine ziemlich rasche Adaptation und Regeneration ermöglichen sollte, ist anzunehmen, daß eine Regulation mittels Abbau und Aufbau von Rezeptoren wesentlich mehr Zeit beansprucht.

Mickey et al. (57) zeigten an Frosch-Erythrozyten und Dibner und Molinoff (24) an Schnitten von Rattengehirn, daß β-adrenerge Rezeptoren und die mit ihnen verbundene AC durch die Inkubation mit Isoproterenol in vitro desensibilisiert werden: die maximale Stimulierbarkeit der AC nimmt ab, während die Affinität zum Neurotransmitter erhalten bleibt. Dieser Adaptationsprozeß benötigt bei Erythrozyten ca. 2 - 3 h und in Gehirnschnitten nur ca. 20 min. Offensichtlich haben die β-Rezeptoren die Fähigkeit, sich an die vorliegende Neurotransmitter-Konzentration anzupassen. Diese Adaptation erfolgt schnell und ist voll reversibel, reversibel in einer Synaptosomen-Präparation, in der keine Proteinbiosynthese zu erwarten ist. Die Rezeptorendichte wird also wahrscheinlich über Veränderungen an den Rezeptoren reguliert. Dibner und Molinoff (24) beschreiben ferner, daß die in vitro Effekte von Isoproterenol mit dem chronischen DMI-Effekt additiv sind, aber nur der Isoproterenol-Anteil der Subsensitivität rasch reversibel ist. Dies legt die Vermutung nahe, daß die schnelle Adaptation an hohe Isoproterenol-Konzentrationen und die langsam sich entwickelnde IMI-Subsensitivität unterschiedliche Mechanismen haben.

U'Prichard und Enna (97) zeigten, daß Antidepressiva in vitro auch zu einer Desensibilisierung von β-Rezeptoren führen, die nicht mit einem Isoproterenol-Effekt additiv ist. Sie beschreiben eine Änderung der Rezeptorendichte nach 2 h Inkubation mit 100 µM DMI, einer sicher unphysiologisch hohen Konzentration. Dies deuten sie als den ersten Schritt zur langfristigen Regulation der Rezeptorendichte. Ihre Daten stehen allerdings in Widerspruch zu Ergebnissen dieser Arbeit. 10 µM DMI in

vitro bewirken eine Veränderung der Rezeptoraffinität, entsprechend einer kompetitiven Hemmung.

Dagegen, daß IMI oder DMI die postsynaptische Rezeptorendichte unmittelbar regulieren, spricht auch, daß funktionsfähige präsynaptische Nervenendigungen Voraussetzung für eine IMI-Wirkung sind (4.1.4.). Zerstört man die präsynaptischen noradrenergen Fasern durch die Injektion von 6-OHDA, so bleibt eine nachfolgende IMI-Behandlung ohne Auswirkung auf die NA-stimulierten cAMP-Spiegel, wie auch von Schweitzer (85) gezeigt wurde. Umgekehrt ist eine 6-OHDA-Injektion in IMI behandelten Tieren wirkungslos, eine Demonstration für die Bedeutung der Rückaufnahmehemmung für die Wirkung von IMI.

Diese Daten geben einen deutlichen Hinweis darauf, daß für die postsynaptische Verminderung der β-Rezeptorendichte unter der chronischen Einwirkung von IMI ein präsynaptischer Mechanismus zumindest mitverantwortlich ist. Es handelt sich also bei der kurz- bzw. langfristigen Rezeptorenregulation mit großer Wahrscheinlichkeit um unterschiedliche Mechanismen.

In diesem Zusammenhang gewinnen Arbeiten, die sich mit der präsynaptischen Wirkung von Antidepressiva beschäftigen, an Bedeutung. U'Prichard et al. (98) beschrieben, daß trizyklische Antidepressiva an α-Rezeptoren binden und daß die Affinität der Pharmaka zu den α-Rezeptoren mit der Stärke der therapeutischen Wirkung korreliert.

Crews und Smith (22) sowie Svensson und Usdin (92) konnten in unterschiedlichen Systemen zeigen, daß unter der Langzeitbehandlung mit DMI präsynaptische α-Rezeptoren gegenüber NA subsensitiv werden. McMillen et al. (56) wiesen nach, daß es sich hierbei aller Wahrscheinlichkeit nach um α_2-Rezeptoren handelt. Präsynaptische

α-Rezeptoren regulieren in Form eines Rückkopplungsmechanismus die Ausschüttung von NA (48,49,50,90,91). Eine α-Rezeptorsubsensitivität oder eine Blockade durch α-Antagonisten führt also zu einer verstärkten NA-Ausschüttung.

Man könnte sich die Reaktionsfolge, die zur Verminderung der Anzahl adrenerger Rezeptoren führt, daher wie folgt vorstellen:

IMI bzw. DMI hemmen die Rückaufnahme von NA in das präsynaptische Axon und blockieren präsynaptische α-Rezeptoren, was zu einer verstärkten NA-Ausschüttung führt. Beides bewirkt eine starke Erhöhung der NA-Konzentration im synaptischen Spalt. Durch die erhöhte NA-Konzentration werden adaptive Vorgänge in Bewegung gesetzt, die zu einer Subsensitivität präsynaptischer α-Rezeptoren und postsynaptischer β-Rezeptoren führen. Diese verringerte Empfindlichkeit der Rezeptoren ist als eine langfristige Veränderung der Rezeptorendichte zu verstehen. Inwieweit die erhöhten NA-Konzentrationen im synaptischen Spalt über die Erregung postsynaptischer α-Rezeptoren - in Form einer "Feedforward-Hemmung" der Rezeptor-Neusynthese - die postsynaptische β-Rezeptorendichte regeln, ist nicht geklärt. Durch die verstärkte Ausschüttung und gehemmte Rückaufnahme von NA kommt es vorübergehend zu einer Senkung der NA-Spiegel im Gehirn (80), die sich aber mit längerer Behandlungsdauer wieder annähernd normalisieren, vielleicht durch einen verstärkten NA-Anabolismus.

Dieses Konzept scheint für die Großhirnrinde schlüssig und in Übereinstimmung mit den vorliegenden experimentellen Ergebnissen zu sein.

Läßt sich dieses Modell auf andere Gehirnteile übertragen ?

Im Hippocampus ist ebenfalls eine ß-adrenerge Subsensitivität nach IMI feststellbar (4.1.3.). Maggi et al. (54) beschreiben für den Hippocampus auch eine verringerte DHA-Bindungsfähigkeit. Vetulani et al. (99) finden im sogenannten "limbic forebrain" die gleichen Ergebnisse. Im Corpus striatum hingegen ist keine noradrenerge Subsensitivität meßbar (4.1.3.), und auch das dopaminerge System bleibt unbeeinflußt. Maggi et al. (54) zeigten für das Corpus striatum allerdings eine verminderte Empfindlichkeit serotoninerger Rezeptoren, die sie nach einer IMI-Behandlung auch in der Großhirnrinde und im Hippocampus fanden.

Die Daten von Maggi stehen jedoch in Widerspruch zu Ergebnissen von Bergstrom et al. (12) und zu eigenen Untersuchungen (4.6.). Es konnte in keinem der genannten Gehirnteile eine geringere Bindung von 5-HT nach einer IMI-Behandlung festgestellt werden. Es konnte aber gezeigt werden, daß DMI an 5-HT-Rezeptoren bindet (4.6.3.). So könnte im 5-HT-Bindungstest, wenn DMI nicht genügend ausgewaschen wird, eine Subsensitivität der 5-HT-Rezeptoren vorgetäuscht werden.

Erstaunlich ist bei den Daten von Maggi et al. (54), daß nach DMI-Gabe keine signifikante Subsensitivität im Corpus striatum und im Hippocampus auftritt. Schocker (80) konnte nachweisen, daß IMI im Gehirn sehr rasch zu DMI verstoffwechselt wird. IMI und DMI sollten also bei der chronischen Behandlung die gleiche Wirkung entfalten.

De Montigny und Aghajanian (62) beschrieben mit einem pharmakologischen Modell sogar eine gesteigerte 5-HT-Reaktion im Vorderhirn nach der Langzeitbehandlung mit

antidepressiven Arzneimitteln.

Wie das serotoninerge System am Wirkungsmechanismus von antidepressiven Pharmaka beteiligt ist, bleibt unklar.

Das Cerebellum ist am depressiven Geschehen sicher nicht oder nur unbedeutend beteiligt. Trotzdem ist das Studium der IMI-Wirkung gerade in diesem Gehirnteil von größtem Interesse. Einerseits können Veränderungen im Cerebellum die Ursache von Nebenwirkungen einer antidepressiven Therapie - z.B. motorischer Störungen - sein. andererseits ist kein anderes Gehirnteil elektrophysiologisch so gut charakterisiert wie das Kleinhirn. Dies liegt an der verhältnismäßig einfachen Architektur der Cortex cerebelli (vgl. 4.7.1.). Es bietet sich im Cerebellum also die Möglichkeit, elektrophysiologische Daten mit biochemischen Ergebnissen zu korrelieren.

Die Ergebnisse im Cerebellum erscheinen auf den ersten Blick verwirrend. Von Schocker (80) konnte keine signifikante Subsensitivität des noradrenergen cAMP-Systems nach IMI gefunden werden. Elektrophysiologische Untersuchungen von Siggins und Schultz (88) zeigen jedoch Veränderungen an den cerebellaren Purkinje-Zellen im Sinne einer noradrenergen Subsensitivität. Bindungsstudien mit DHA ergeben ebenfalls eine Abnahme der Empfindlichkeit noradrenerger Rezeptoren (4.5.3.). Die Auftragung nach Scatchard (78) zeigt, daß nach einer IMI-Behandlung die Rezeptorendichte verringert ist.

Warum ist im Cerebellum die Subsensitivität des noradrenergen cAMP-Systems mit der "unschärferen" Methode des Bindungstests nachweisbar, nicht aber durch die Messung der cAMP-Spiegel ?

Skolnick et al. (89) postulieren, daß im Cerebellum

mindestens zwei verschiedene β-Rezeptor-Populationen durch NA stimulierbar sind, wobei der eine Rezeptor-Typ an den Purkinje-Zellen lokalisiert ist. Minneman et al. (60) entwickelten eine Methode, mit der es möglich ist, β_1- und β_2-adrenerge Rezeptoren nebeneinander zu bestimmen. Periphere β_1-Rezeptoren haben zu NA und Adrenalin etwa die gleiche Affinität und kommen im Herz und in Fettgewebe gehäuft vor; periphere β_2-Rezeptoren haben zu NA eine etwa zehnmal geringere Affinität als zu Adrenalin und kommen in Lunge, Leber und Muskel gehäuft vor (59). Im Gehirn kommen beide Rezeptor-Typen vor, sind aber nicht gleichmäßig verteilt. So ist das Verhältnis β_2- : β_1-Rezeptoren in der Cortex cerebri ca. 2 : 8 (ähnlich dem Herzen) im Cerebellum aber gerade umgekehrt ca. 8 : 2 (wie in der Lunge). Die Rezeptorenverteilung in anderen Gehirnteilen ist entweder wie im Hippocampus ähnlich der Cortex cerebri oder nimmt eine mittlere Stellung ein (60). Minneman et al. konnten auch zeigen, daß durch eine DMI-Behandlung fast nur die β_1-Rezeptoren beeinflußt werden (58).

Nimmt man an, daß die β_1-Rezeptoren im Cerebellum an den Purkinje-Zellen lokalisiert sind, die β_2-Rezeptoren aber an anderen Zellen (Körnerzellen?) und daß beide Rezeptor-Typen mit einer AC gekoppelt sind, so kann man folgendes Modell aufstellen: Durch die IMI-Behandlung werden die β_1-Rezeptoren tragenden Purkinje-Zellen subsensitiv gegen NA, was im DHA-Bindungstest und elektrophysiologisch nachgewiesen werden kann, nicht aber bei der Messung der cAMP-Spiegel, da bei dieser Methode die β_2-Rezeptoren in stärkerem Maße miterfaßt werden.

Diese These kann durch zwei Beobachtungen gestützt werden. Minneman et al. (61) finden, daß durch eine Röntgenbestrahlung neugeborener Ratten, bei der selektiv die Purkinje-Zellen überleben, die β_2-Rezeptorenanzahl um

80% reduziert wird, während die β_1-Rezeptorenanzahl unverändert bleibt. Palacios und Kuhar (65) finden bei dem Versuch, β-Rezeptoren im Gehirn autoradiographisch mit Hilfe von tritiertem DHA zu lokalisieren, eine große Rezeptorendichte in der molekularen und in der Purkinje-Zellschicht, was auf einen starken noradrenergen "Input" der Purkinje-Zellen schließen läßt, aber nur sehr wenige β-Rezeptoren in der gekörnten Schicht, wahrscheinlich, weil DHA unter ihren Inkubationsbedingungen kaum an β_2-Rezeptoren bindet.

Weitere Aufschlüsse konnten Untersuchungen der cAMP-Spiegel im degranulierten Cerebellum geben. In Übereinstimmung mit der Hypothese wurde im degranulierten Cerebellum - das als neuronale Zellen fast nur Purkinje-Zellen enthält - das cAMP-System durch eine IMI-Behandlung subsensitiv gegen NA (4.7.3.).

Der für die Großhirnrinde postulierte Mechanismus für die IMI-Wirkung kann also - mit der Erweiterung, daß nur β_1-Rezeptoren beeinflußt werden (β_2-Rezeptoren spielen in der Cortex cerebri nur eine untergeordnete Rolle (60)) - auf das Kleinhirn übertragen werden.

Inwieweit dieser Mechanismus auf andere Antidepressiva übertragen werden kann, ist fraglich. Interessant ist, daß eine Elektroschockbehandlung ebenfalls zu einer β-adrenergen Subsensitivität führt (67). Vetulani et al. (99) beschreiben eine Subsensitivität auch nach chronischer Iprindolgabe. In einer anderen Veröffentlichung zeigt die gleiche Gruppe eine Supersensitivität nach Reserpin-Behandlung; Reserpin verstärkt bekanntlicherweise die Depression (100).

In den letzten Jahren befaßten sich mehrere Arbeitsgruppen - offensichtlich angeregt durch die Erfolge bei der Erforschung der Opiat-Rezeptoren und die Entdeckung

des "Diazepam-Rezeptors" - mit dem "IMI-Rezeptor". Sie postulieren, daß die trizyklischen Antidepressiva mit einem bis heute unbekannten Neurotransmittersystem unmittelbar in Wechselwirkung treten (44,51,72,74). Eine Veröffentlichung von Briley et al. (16), die zeigt, daß depressive Patienten über weniger "IMI-Rezeptoren" verfügen, macht die physiologische Relevanz solcher Bindungsstellen eher unwahrscheinlich. Erstens kann er keine Korrelation zwischen dem Grad der Depression und der Anzahl der IMI-Bindungsstellen nachweisen und zweitens ändert sich die Anzahl der Bindungsstellen durch die Behandlung mit trizyklischen Antidepressiva nicht. Gegen eine physiologische Relevanz spricht ferner die Tatsache, daß einige klinisch erprobte Antidepressiva wie Iprindol oder Mianserin fast gar nicht an den "IMI-Rezeptor" binden.

5.2. Lithium

Wie schon in der Einleitung dargelegt, ist die Diskussion um den Wirkungsmechanismus von Lithium wesentlich breiter gefächert. Eine Vielzahl von Theorien, deren keine bewiesen oder widerlegt ist, stehen gleichberechtigt nebeneinander. So gibt es die Hypothese, daß Li^+-Ionen Ionentransportsysteme beeinflussen (32) oder daß Lithium die Membran stabilisiert (33,93). Andere Autoren glauben, daß Lithium die AC unmittelbar verändert (26,27, 30).

Die Untersuchungen von Siggins und Schultz (88) und Schultz et al. (84) lassen die Hypothese interessant erscheinen, daß Lithium - wie die trizyklischen Antidepressiva - die β-adrenergen Rezeptoren beeinflußt, aber im Gegensatz zu jenen keine Subsensitivität, sondern eine erhöhte Empfindlichkeit bewirkt.

In allen untersuchten Gehirnteilen war eine neuntägige Lithium-Behandlung ohne signifikante Auswirkungen auf die durch NA stimulierten cAMP-Spiegel (4.2.). So ist es nicht verwunderlich, daß auch bei Bindungsstudien keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Lithium-Tieren festgestellt werden konnten (4.5.4.). Auch im degranulierten Cerebellum war eine Lithium-Behandlung ohne Auswirkung auf das noradrenerge cAMP-System (4.7.4. und 4.7.5.).

Rosenblatt et al. (75) beschreiben zwar nach 3 - 5 Wochen Lithium-Behandlung eine Verminderung β-adrenerger Rezeptoren und eine Zunahme α-adrenerger Rezeptoren, diese Daten stehen aber zu den hier gezeigten Ergebnissen und zu Befunden von Treiser und Kellar (95) in Widerspruch. Eine β-adrenerge Subsensitivität läßt sich auch kaum mit einer elektrophysiologisch nachweisbaren erhöhten Empfindlichkeit der Purkinje-Zellen in Einklang bringen.

Es ist also anzunehmen, daß die Lithium-Wirkung nicht auf einer Veränderung des noradrenergen cAMP-Systems beruht. Die noradrenerge Supersensitivität der Purkinje-Zellen im elektrophysiologischen Experiment muß dann eine andere Ursache haben, vielleicht eine durch die Lithium-Behandlung bedingte Stabilisierung des Membranpotentials. Es ist auch denkbar, daß Lithium seine Wirkung über die noradrenergen Axone vom Locus coeruleus (42) entfaltet.

Lithium und IMI beeinflussen nach den Ergebnissen dieser Arbeit unterschiedliche Systeme im Gehirn. Das depressive Geschehen ist sicher vielschichtiger, als lange Zeit angenommen wurde, und ist nicht durch einen einfachen Mechanismus erklärbar.

6. Zusammenfassung

Ratten wurden 9 Tage lang mit IMI oder Lithium behandelt, um die Auswirkungen einer solchen Behandlung auf das noradrenerge und serotoninerge System in verschiedenen Gehirnteilen zu untersuchen.

IMI bewirkt in der Cortex cerebri schon in geringen Dosierungen eine Subsensitivität des noradrenergen cAMP-Systems, die auf eine verminderte β-Rezeptorendichte zurückzuführen ist. Im Hippocampus ist das gleiche Ergebnis feststellbar, während im Corpus striatum keine meßbaren Veränderungen auftreten.

Im Cerebellum ist die β-Rezeptorendichte nach 9 Tagen IMI vermindert, scheinbar ohne signifikanten Einfluß auf das cAMP-System. Degranuliert man Ratten durch neonatale Röntgenbestrahlung, so ist nach einer IMI-Behandlung im Cerebellum eine noradrenerge Subsensitivität des cAMP-Systems signifikant. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, daß nur die an den Purkinje-Zellen lokalisierten β_1-Rezeptoren durch die IMI-Behandlung vermindert werden.

Auf das serotoninerge System konnte in keinem der untersuchten Gehirnteile ein Einfluß einer IMI-Behandlung festgestellt werden, wobei zu bemerken ist, daß DMI in therapeutischen Konzentrationen in vitro die 5-HT-Rezeptorbindung hemmt.

Lithium ist ohne meßbaren Einfluß auf das noradrenerge cAMP-System.

Aus den eigenen Daten wurde im Vergleich mit der Literatur ein Modell für den IMI-Wirkungsmechanismus erstellt, das die Katecholamintheorie erweitert. Ob dieses

Modell auf andere Antidepressiva übertragen werden kann, ist - nicht zuletzt auf Grund der Ergebnisse mit Lithium - fraglich.

7. Literatur

1) Altman, J.: Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I. The external germinal layer and the transitional molecular layer. J. Comp. Neurol. 145, 353 - 398 (1972)

2) Altman, J.: Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. J. Comp. Neurol. 145, 399 - 464 (1972)

3) Altman, J.: Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. III. Maturation of the components of the granular layer. J. Comp. Neurol. 145, 465 - 514 (1972)

4) Altman, J., Anderson, W.J.: Experimental reorganization of the cerebellar cortex. I. Morphological effects of elimination of all microneurons with prolonged X-irradiation started at birth. J. Comp. Neurol. 146, 355 - 406 (1972)

5) Altman, J.: Experimental reorganization of the cerebellar cortex. V. Effects of early X-irradiation schedules that allow or prevent the acquisition of basket cells. J. Comp. Neurol. 165, 31 - 47 (1976)

6) Altman, J., Anderson, W.J.: Irradiation of the cerebellum in infant rats with low-level X-ray: Histological and cytological effects during infancy and adulthood. Exp. Neurol. 30, 492 - 509 (1971)

7) Altman, J., Anderson, W.J., Wright, K.A.: Gross morphological consequences of irradiation of the cerebellum in infant rats with repeated

doses of low-level X-ray. Exp. Neurol. 21, 69 - 91 (1968)

8) Axelrod, J., Whitby, L.G., Hertting, G.: Effect of psychotropic drugs on the uptake of ^{3}H-norepinephrine by tissues. Science 133, 383 - 384 (1961)

9) Banerjee, S.P., Kung, L.S., Riggi, S.J., Chanda, S. K.: Development of β-adrenergic receptor subsensitivity by antidepressants. Nature 268, 455 - 456 (1977)

10) Bayer, S.A., Altman, J.: The effects of X-irradiation on the postnatally-forming granule cell populations in the olfactory bulb, hippocampus and cerebellum of the rat. Exp. Neurol 48, 167 - 174 (1975)

11) Bayer, S.A., Peters, P.J.: A method for X-irradiating selected brain regions in infant rats. Brain Res. Bul. 2, 153 - 156 (1977)

12) Bergstrom, D.A., Bortz, R.J., Kellar, K.J.: Adrenergic and serotoninergic receptor binding in brain after chronic desipramine (DMI) treatment. Fed. Proc. 37, 582 (1978)

13) Bergstrom, D.A., Kellar, K.J.: Adrenergic and serotoninergic receptor binding in rat brain after chronic desmethylimipramine treatment. J. Pharmacol. Exp. Ther. 209, 256 - 261 (1979)

14) Bloom, F.E., Hoffer, B.J., Siggins, G.R.: Studies on norepinephrine-containing afferents to Purkinje cells of rat cerebellum. I. Localization of the fibers and their synapses. Brain. Res. 25, 501 - 521 (1971)

15) Bray, G.A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aequeous solutions in a liquid

scintillation counter. Anal. Biochem. 1, 279 - 285 (1960)

16) Briley, M.S., Langer, S.Z., Raisman, R., Sechter, D., Zarifian, E.: Tritiated imipramine binding sites are decreased in platelets of untreated depressed patients. Science 209, 303 - 305 (1980)

17) Bylund, J.B., Snyder, S.H.: Beta adrenergic receptor binding in membrane preparations from mammalian brain. Mol. Pharmacol. 12, 568 - 580 (1976)

18) Carlsson, A., Fuxe, K., Ungerstedt, U.: The effect of imipramine on central 5-hydroxytryptamine neurons. J. Pharm. Pharmacol. 20, 150 - 151 (1968)

19) Cassel, D., Pfeuffer, T.: Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2269 - 2273 (1978)

20) Cassel, D., Selinger, Z.: Activation of turkey erythrocyte adenylate cyclase and blocking of the catecholamine-stimulated GTPase by guanosine-5'-(γ-thio)triphosphate. Biochem. Biophys. Res. Com. 77, 868 - 873 (1977)

21) Crepel, F., Moriani, J.: Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum from mutant mice. I. Electrophysiological analysis of cerebellar cortical neurons in the staggerer mouse. Brain Res. 98, 135 - 147 (1975)

22) Crews, F.T., Smith, C.B.: Presynaptic alpha-receptor subsensitivity after long-term antidepressant treatment. Science 202, 322 - 324 (1978)

23) Daly, J.W.: The nature of receptors regulating the formation of cyclic AMP in brain tissue. Life Sciences 18, 1349 - 1358 (1976)

24) Dibner, M.D., Molinoff, P.B.: Agonist-induced changes in beta adrenergic receptor density and receptor-mediated responsiveness in slices of rat cerebral cortex. J. Pharmacol. Exp. Ther. 201, 433 - 439 (1979)

25) Domenjoz, R., Theobald, W.: Zur Pharmakologie des Tofranil^{R} (N-(3-Dimethylaminopropyl)-iminodibenzyl-hydrochlorid). Arch. Int. Pharmacodyn. 120, 450 - 489 (1959)

26) Ebstein, R., Belmaker, R., Grunhaus, L., Rimon, R.: Lithium inhibition of adrenaline-stimulated adenylate cyclase in humans. Nature 259, 411 - 413 (1976)

27) Ebstein, P.R., Reches, A., Belmaker, R.H.: Lithium inhibition of the adenosine-induced increase of adenylate cyclase activity. J. Pharm. Pharmcol. 30, 122 - 123 (1978)

28) Forn, J., Krueger, B.K., Greengard, P.: Adenosine-3',5'-monophosphate content in rat caudate nucleus: demonstration of dopaminergic and adrenergic receptors. Science 186, 1118 - 1119 (1974)

29) Forn, J., Valdecasas, F.G.: Effects of lithium on brain adenyl cyclase activity. Biochem. Pharmacol. 20, 2773 - 2779 (1971)

30) Frazer, A., Haugaard, E.S., Mendels, J., Haugaard, N.: Effects of intracellular lithium on epinephrine-induced accumulation of cyclic AMP in skeletal muscle. Biochem. Pharmacol. 24, 2273 - 2277 (1975)

31) Frazer, A., Hess, M.E., Mendels, J., Gable, B., Kunkel, E., Bender, A.: Influence of acute and chronic treatment with desmethylimipramine on catecholamine effects in the rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 206, 311 - 319 (1978)

32) Frazer, A., Mendels, J., Brunswick, D., Ramsey, T. A.: Transfer of sodium ions across the erythrocyte membrane in manic-depressive illness: treatment with lithium carbonate. Life Sciences 22, 157 - 164 (1978)

33) Friedman, E., Dallob, A., Levine, G.: The effect of long-term lithium treatment on reserpine-induced supersensitivity in dopaminergic and serotoninergic transmission. Life Sciences 25, 1263 - 1266 (1979)

34) Gallager, D.W., Bunney, W.E.: Failure of chronic lithium treatment to block tricyclic antidepressant-induced 5-HT supersensitivity. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 307, 129 - 133 (1979)

35) Gilman, A.G.: A protein binding assay for cyclic AMP. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 305 - 312 (1970)

36) Glowinski, J., Iversen, L.L.: Regional studies of catecholamines in the brain - I. The disposition of ^{3}H-norepinephrine, ^{3}H-dopamine and ^{3}H-dopa in various regions of the brain. J. Neurochem. 13, 655 - 669 (1966)

37) Greengard, P., McAfee, D.A., Kebebian, J.W.: On the mechanism of action of cyclic AMP and its role in synaptic transmission. Adv. Cyc. Nucl. Res. 1, 337 - 355 (1972)

38) Hicks, S.P., D'Amato, C.J.: Effects of ionizing radiations on mammalian development. In:

Advances in Teratology, D.H.M. Woollam, ed., Logos Press, London, 195 - 250 (1966)

39) Hoekfelt, T., Fuxe, K.: Cerebellar afferent nerve terminals: A new type of afferent fiber to the cortex cerebelli. Exp. Brain Res. 9, 63 - 72 (1969)

40) Hoffer, B.J., Freedman, R., Woodward, D.J., Daly, J.W., Skolnick, P.: β-adrenergic control of cAMP-generating systems in cerebellum: Pharmacological heterogeneity confirmed by destruction of interneurons. Exp. Neurol. 51, 653 - 667 (1976)

41) Hoffer, B.J., Siggins, G.R., Bloom, F.E.: Studies on norepinephrine-containing afferents to Purkinje cells of rat cerebellum. II. Sensitivity of Purkinje cells to norepinephrine and related substances adminstered by microiontophoresis. Brain Res. 25, 523 - 534 (1971)

42) Hoffer, B.J., Siggins, G.R., Oliver, A.P., Bloom, F.E.: Activation of the pathway from locus coeruleus to rat cerebellar Purkinje neurons: Pharmacological evidence of noradrenergic central inhibition. J. Pharmacol. Exp. Ther. 184, 553 - 569 (1973)

43) Huang, M., Ho, A.K.S., Daly, J.W.: Accumulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate in rat cerebral cortical slices: Stimulatory effect of α- and β-adrenergic agents after treatment with 6-hydroxydopamine, 2,3,5-trihydroxyphenethylamine and dihydroxytryptamines. Mol. Pharmacol. 9, 711 - 717 (1973)

44) Hunt, P.F., Kannengiesser, M.H., Raynaud, J.P.: The nature of ^{3}H-imipramine binding to synaptosomes. Biochem. Pharmacol. 24, 681 - 685 (1975)

45) Kuhn, R.: Über die Behandlung depressiver Zustände mit einem Iminodibenzylderivat (G 22355). Schweiz. med. Wschr. 87, 1135 - 1140 (1957)

46) Landis, S.C., Bloom, F.E.: Ultrastructural identification of noradrenergic boutons in mutant and normal mouse cerebellar cortex. Brain. Res. 96, 229 - 305 (1975)

47) Landis, S.C., Shoemaker, W.J., Schlumpf, M., Bloom, F.E.: Catecholamines in mutant mouse cerebellum: fluorescence microscopic and chemical studies. Brain Res. 93, 253 - 266 (1975)

48) Langer, S.Z.: Presynaptic regulation of catecholamine release. Biochem. Pharmacol. 23, 1793 - 1800 (1974)

49) Langer, S.T.: Presynaptic receptors and their role in the regulation of noradrenaline release. Brit. J. Pharmacol. 60, 481 - 497 (1977)

50) Langer, S.Z.: Presynaptic receptors and modulation of neurotransmission: pharmacological implications and therapeutic relevance. TINS 3, 110 - 112 (1980)

51) Langer, S.Z., Raisman, R., Briley, M.S.: Stereoselective inhibition of ^{3}H-imipramine binding by antidepressant drugs and their derivatives. Eur. J. Pharmacol. 64, 89 - 90 (1980)

52) Levitzki, A.: The role of GTP in the activation of adenylate cyclase. Biochem. Biophys. Res. Com. 74, 1154 - 1159 (1977)

53) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

54) Maggi, A., U'Prichard, D.C., Enna, S.J.: Differential effects of antidepressant treatment on

brain monoaminergic receptors. Eur. J. Pharmacol. 61, 91 - 98 (1980)

55) Mandell, A.J., Knapp, S., Hsu, L.L.: Some factors in the regulation of central serotoninergic synapses. Life Sciences 14, 1 - 17 (1974)

56) McMillen, B.A., Warnack, W., German, D.C., Shore, P.A.: Effects of chronic desipramine treatment on rat brain noradrenergic responses to α- adrenergic drugs. Eur. J. Pharmacol. 61, 239 - 246 (1980)

57) Mickey, J.V., Tate, R., Mullikin, J., Lefkowitz, R.J.: Regulation of adenylate cyclase coupled beta adrenergic receptor binding sites by β-adrenergic catecholamines in vitro. Mol. Pharmacol. 12, 409 - 419 (1976)

58) Minneman, K.P., Dibner, M.D., Wolfe, B.B., Molinoff, P.B.: β_1- and β_2-adrenergic receptors in rat cerebral cortex are independently regulated. Science 204, 866 - 868 (1979)

59) Minneman, K.P., Hegstrand, L.R., Molinoff, P.B.: The pharmacological specifity of β_1 and β_2 adrenergic receptors in rat heart and lung in vitro. Mol. Pharmacol. 16, 21 - 33 (1979)

60) Minneman, K.P., Hegstrand, L.R., Molinoff, P.B.: Simultaneous determination of β_1 and β_2 adrenergic receptors in tissues containing both receptor subtypes. Mol. Pharmacol. 16, 34 - 46 (1979)

61) Minneman, K.P., Pittman, R.N., Yeh, H., Woodward, D.J., Molinoff, P.B.: Selective survival of β_1-adrenergic receptors in rat cerebellum after neonatal X-irradiation. im Druck

62) de Montigny, C., Aghajanian, G.K.: Tricyclic anti-

depressants: long-term treatment increases responsivity of rat forebrain neurons to serotonin. Science 202, 1303 - 1306 (1978)

63) du Moulin, A.: Untersuchungen zur Regulation der Aktivitäten von Phosphodiesterasen und der Adenylat Cyclase aus Hirngewebe. Dissertation, Tübingen 1978

64) Olson, C., Fuxe, K.: On the projections from the locus coeruleus noradrenaline neurons: The cerebellar innervation. Brain Res. 28, 165 - 171 (1971)

65) Palacios, J.M., Kuhar, M.J.: Beta-adrenergic-receptor localization by light microscopic autoradiography. Science 208, 1378 - 1380 (1980)

66) Palay, S.L., Chan-Palay, V.: Cerebellar cortex Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1974

67) Pandey, G.N., Heinze, W.J., Brown, B.D., Davis, J. M.: Electroconvulsive shock treatment decreases β-adrenergic receptor sensitivity in rat brain. Nature, 280, 234 - 235 (1979)

68) Peroutka, S.J., Snyder, S.H.: Multiple serotonin receptors: differential binding of (^{3}H)5-hydroxytryptamine, (^{3}H)lysergicaciddiethylamid and (^{3}H)spiroperidol. Mol. Pharmacol. 16, 687 - 699 (1979)

69) Pert, A., Rosenblatt, J.E., Sivit, C., Pert, C.B., Bunney, W.E.jr.: Long-term treatment with lithium prevents the development of dopamine receptor supersensitivity. Science 201, 171 - 173 (1978)

70) Pöch, G.: Assay of phosphodiesterase with radioactively labeled cyclic 3',5'-AMP as substrate.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 268, 272 - 299 (1971)

71) Puro, D.G., Woodward, D.J.: Physiological properties of afferents and synaptic reorganization in the rat cerebellum degranulated by postnatal X-irradiation. J. Neurobiol. 9, 195 - 215 (1978)

72) Raisman, R., Briley, M., Langer, S.Z.: Specific tricyclic antidepressant binding sites in rat brain. Nature 281, 148 - 150 (1979)

73) Reches, A., Ebstein, R.P., Belmaker, R.H.: The differential effect of lithium on noradrenaline- and dopamine-sensitive accumulation of cyclic AMP in guinea pig brain. Psychopharmacology 58, 213 - 216 (1978)

74) Rehavi, M., Paul, S.M., Skolnick, P., Goodwin, F.K.: Demonstration of specific high affinity binding sites for ^{3}H-imipramine in human brain. Life Sciences 26, 2273 - 2279 (1980)

75) Rosenblatt, J.E., Pert, C.B., Tallman, J.F., Pert, A., Bunney, W.E.jr.: The effect of imipramine and lithium on α- and β-receptor binding in rat brain. Brain Res. 160, 186 - 191 (1979)

76) Salomon, Y., Londos, C., Rodbell, M.: A highly sensitive adenylate cyclase assay. Anal. Biochem. 58, 541 - 548 (1974)

77) Sarai, K., Frazer, A., Brunswick, D., Mendels, J.: Desmethylimipramine induced decrease in β-adrenergic receptor binding in rat cerebral cortex. Biochem. Pharmacol. 27, 2179 - 2181 (1978)

78) Scatchard, G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660 - 672 (1949)

79) Schildkraut, J.J.: The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. Am. J. Psychiat. 122, 509 - 522 (1965)

80) Schocker, W.F.: Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Imipramin. Dissertation, Tübingen 1979

81) Schultz, J.: Psychoactive drug effects on a system which generates cyclic AMP in brain. Nature 261, 417 - 418 (1976)

82) Schultz, J., Daly, J.W.: Accumulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in cerebral cortical slices from rat and mouse: stimulatory effect of α- and β-adrenergic agents and adenosine. J. Neurochem. 21, 1319 - 1326 (1973)

83) Schultz, J., Kleefeld, G., du Moulin, A.: Adenylate cyclase and phosphodiesterase from brain tissue: Different stabilities during incubation of cerebral cortical slices. Experientia 34, 1432 - 1433 (1978)

84) Schultz, J.E., Siggins, G.R., Schocker, F.W., Türck, M., Bloom, F.E.: Effects of prolonged treatment with lithium and tricyclic antidepressants on discharge frequency, norepinephrine responses and β-receptor-binding in rat cerebellum: electrophysiological and biochemical comparison. J. Pharmacol. Exp. Ther., im Druck

85) Schweitzer, J.W., Schwartz, R., Friedhoff, A.J.: Intact presynaptic terminals required for β-adrenergic receptor regulation by desipramine. J. Neurochem. 33, 377 - 379 (1979)

86) Siggins, G.R., Henriksen, S.J., Landis, S.C.: Electrophysiology of Purkinje neurons in the Weaver-mouse: Iontophoresis of neurotransmitters and cyclic nucleotides, and stimulation of the

locus coeruleus. Brain Res. 114, 53 - 69 (1976)

87) Siggins, G.R., Hoffer, B.J., Bloom, F.E.: Studies on norepinephrine-containing afferents to Purkinje cells of rat cerebellum. III. Evidence for mediation of norepinephrine effects by cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. Brain Res. 25, 535 - 553 (1971)

88) Siggins, G.R., Schultz, J.E.: Chronic treatment with lithium or desipramine alters discharge frequency and norepinephrine responsiveness of cerebellar Purkinje cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5987 - 5991 (1979)

89) Skolnick, P., Daly, J.W., Freedman, R., Hoffer, B. J.: Interrelationship between catecholamine-stimulated formation of adenosine 3',5'-monophosphate in cerebellar slices and inhibitory effects on cerebellar Purkinje cells: Antagonism by neuroleptic compounds. J. Pharmacol. Exp. Ther. 197, 280 - 292 (1976)

90) Starke, K.: Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 77, 1 - 124 (1977)

91) Stjärne, L., Brundin, J.: Dual adrenoceptor-mediated control of noradrenaline secretion from human vasoconstrictor nerves: Facilitation by β-receptors and inhibition by α-receptors. Acta physiol. scand. 94, 139 - 141 (1975)

92) Svensson, T.H., Usdin, T.: Feedback inhibition of brain noradrenaline neurons by tricyclic antidepressants: alpha receptor mediation. Science 202, 1089 - 1091 (1978)

93) Swann, A.C., Heninger, G.R., Marini, J.L., Sheard, M.H., Maas, J.W.: Lithium effects on high-affinity tryptophan uptake: evidence against a

stabilization mechanism. Brain Res. 194, 287 - 292 (1980)

94) Thiele, J., Holzinger, O.: Ueber o-Diamidodibenzyl. J. Liebigs Ann. Chem. 305, 96 - 102 (1899)

95) Treiser, S., Kellar, K.J.: Lithium effects on adrenergic receptor supersensitivity in rat brain. Eur. J. Pharmacol. 58, 85 - 86 (1979)

96) Türck, M., Schocker, W.F., Fathy, A.M., Schultz, J.: Adrenergic subsensitivity of a cell-free adenylate cyclase from rat brain after chronic imipramine treatment. Arch. Pharm. 313, 768 - 773 (1980)

97) U'Prichard, D.C., Enna, S.J.: In vitro modulation of CNS β-receptor number by antidepressants and β-agonists. Eur. J. Pharmacol. 59, 297 - 301 (1979)

98) U'Prichard, D.C., Greenberg, D.A., Sheehan, P.P., Snyder, S.H.: Tricyclic antidepressants: Therapeutic properties and affinity for alpha-noradrenergic receptor binding in the brain. Science 199, 197 - 198 (1978)

99) Vetulani, J., Stawarz, R.J., Dingell, J.V., Sulser, F.: A possible common mechanism of action of antidepressant treatment. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 293, 109 - 114 (1976)

100) Vetulani, J., Stawarz, R.J., Sulser, F.: Adaptive mechanisms of the noradrenergic cyclic AMP generating system in the limbic forebrain of the rat: adaption to persistent changes in the availability of norepinephrine (NE). J. Neurochem. 27, 661 - 666 (1976)

101) Wolfe, B.B., Harden, T.K., Sporn, J.R., Molinoff, P.B.: Presynaptic modulation of β-adrenergic

receptors in rat cerebral cortex following treatment with antidepressants. J. Pharmacol. Exp. Ther. 207, 446 - 457 (1978)

102) Wong, D.T., Bymaster, F.P.: The comparison of Fluoxetine and Nisoxetine with tricyclic antidepressants in blocking the neurotoxicity of p-CA and 6-OHDA in the rat brain. Res. Com. Chem. Pathol. Pharmacol. 15, 221 - 231 (1976)

103) Woodward, D.J., Hoffer, B.J., Altman, J.: Physiological and pharmacological properties of Purkinje cells in rat cerebellum degranulated by postnatal X-irradiation. J. Neurobiol. 5, 283 - 304 (1974)

104) Woodward, D.J., Hoffer, B.J., Siggins, G.R., Bloom, F.E.: The ontogenetic development of synaptic junctions, synaptic activation and responsiveness to neurotransmitter substances in rat cerebellar Purkinje cells. Brain Res. 34, 73 - 97 (1971)

L e b e n s l a u f

Am 14. November 1952 wurde ich als dritter Sohn des Bundesbahndirektors Hermann Türck und seiner Ehefrau Anneliese geb. Bofinger in Stuttgart geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule in Stuttgart-Rohr von 1959 bis 1963 trat ich in das Hegel-Gymnasium in Stuttgart-Vaihingen ein, an dem ich 1971 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1971 bis 1973 arbeitete ich als Apotheker-Praktikant in der Helenen-Apotheke in Stuttgart-Vaihingen. Im September 1973 legte ich die Pharmazeutische Vorprüfung ab.

Im Sommersemester 1974 nahm ich das Studium der Pharmazie an der Universität Tübingen auf. Das Studium habe ich mit der Pharmazeutischen Prüfung im August 1977 abgeschlossen. Im Oktober 1977 erhielt ich die Approbation als Apotheker.

Im Oktober 1977 begann ich unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. J.E. Schultz am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen mit der vorliegenden Dissertation, die ich im Wintersemester 1980/81 abschloß.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren:

Pharmazeutische Biologie	E. Reinhard
Pharmazeutische Chemie	H. Auterhoff
	K.-A. Kovar
	J.E. Schultz
Pharmazeutische Technologie	E. Graf
	H. Hamacher
Pharmakologie	H.P.T. Ammon
Anorganische Chemie	E. Lindner
Organische Chemie	M. Hanack
Physik	H. Krüger
Hygiene	R.E. Bader

vervielfältigungen
f. u. t. müllerbader
Forststraße 18 · 7024 Filderstadt 4
Telefon (07 11) 77 15 67